



**Universidad de Santiago de Compostela**

Departamento de Microbiología y Parasitología

**VALIDACIÓN DE TÉCNICAS DE ELECTROFORESIS  
BIDIMENSIONALES PARA EL ESTUDIO DEL PROTEOMA Y  
COMPLEXOMA DE MEMBRANA EXTERNA DE *Neisseria***

Memoria presentada por **Ana M<sup>a</sup> Abel Souto**  
Para optar al Grado de Doctor en Biología

Santiago de Compostela, marzo de 2008





**D<sup>a</sup> Maria Teresa Criado Álvarez**, Profesora Titular de Microbiología de la Universidad de Santiago de Compostela y **D<sup>a</sup> Sandra Sánchez Poza**, Dra. En Biología por la Universidad de Santiago de Compostela,

**INFORMAN:** Que la presente Tesis doctoral, titulada "**Validación de técnicas de electroforesis bidimensionales para el estudio del proteoma y complexoma de membrana externa de *Neisseria***", que para optar al Grado de Doctor en Biología presenta D<sup>a</sup> Ana M<sup>a</sup> Abel Souto, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Microbiología y Parasitología de esta Universidad y, hallándose concluida, autorizamos su presentación a fin de que pueda ser juzgada por el Tribunal correspondiente.

Santiago de Compostela, marzo de 2008

**M<sup>a</sup> Teresa Criado Álvarez**

**Sandra Sánchez Poza**







Quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que hicieron posible la realización de esta Tesis.

Agradezco a los profesores Carlos Ferreirós y Maria Teresa Criado su valiosa ayuda y siempre sabios consejos durante la elaboración de este trabajo. Quiero agradecer especialmente a Maria Teresa el haberme mantenido enfocada en mis objetivos y a Carlos el servirme de modelo e inspiración.

A Sandra Sánchez, directora de Tesis y compañera, por guiarme en mis primeros pasos en el laboratorio y por ser un apoyo constante.

A Juan, por todas las horas de laboratorio y los cafés compartidos.

A Javier por su apoyo técnico.

Al los doctores I.M. Feavers y E. Rosenqvist por facilitarnos las cepas mutantes utilizadas en este trabajo.

Al Dr. Julio Vázquez y al laboratorio de referencia del meningococo (instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid) por la caracterización de las cepas estudiadas en este trabajo.

Y, por supuesto, a mis padres.





La realización de este trabajo fue posible gracias a:

- La concesión de una Beca Predoctoral de la Xunta de Galicia
- La concesión de un contrato predoctoral para formación de doctores para su incorporación en organismos públicos y privados de investigación de la Comunidad Autónoma de Galicia del Programa María Barbeito
- Las subvenciones obtenidas de la Secretaría Xeral de Investigación e Desenvolvemento. Xunta de Galicia (cod. PGIDT 01B1020301PR)
- Las subvenciones obtenidas de la Secretaría Xeral de Investigación e Desenvolvemento. Xunta de Galicia (cod. PGIDT 05PX11320302PR)
- Las subvenciones obtenidas del Fondo de Investigaciones Sanitarias (FISS) P1050178.







Relación de artículos publicados y en proceso de publicación como resultado del desarrollo de esta Tesis Doctoral:

**Sandra Sánchez, Jesús Arenas, Ana Abel, María Teresa Criado, Carlos M. Ferreirós.** 2005. Analysis of outer membrane protein complexes and heat-modifiable proteins in *Neisseria* strains using two-dimensional diagonal electrophoresis. *Journal of Proteome Research*. 4: 91-95.

**Sandra Sánchez, Ana Abel, Jesús Arenas, María Teresa Criado, Carlos M. Ferreirós.** 2006. Cross-linking analysis of antigenic outer membrane protein complexes of *Neisseria meningitidis*. *Research in Microbiology*, 157: 136-142.

**Ana Abel, Sandra Sánchez, Jesús Arenas, María Teresa Criado, Carlos M. Ferreirós.** 2007. Bioinformatic analysis of outer membrane proteome of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica*. *International Microbiology*, 10: 5-11.

**Juan Marzoa, Ana Abel, Sandra Sánchez, María Teresa Criado, Carlos M. Ferreirós, Ian Feavers.** 2008. Analysis of outer membrane porin complexes of *Neisseria meningitidis* in wild-type and specific knock-out mutant strains. *Proteomics* (sometida)





*A mis padres*

*A Blas*





**Validación de técnicas de electroforesis bidimensionales para el estudio  
del proteoma y complexoma de membrana externa de *Neisseria***





	Página
<b>Antecedentes bibliográficos.....</b>	<b>13</b>
<b>1. <i>Neisseria meningitidis</i> como patógeno .....</b>	<b>15</b>
<b>2. Tendencias actuales en vacunas anti-serogrupo B.....</b>	<b>19</b>
2.1 <i>Vacunas basadas en OMVs, proteínas mayoritarias,</i> <i>proteínas de unión a hierro.....</i>	<b>24</b>
2.2 <i>Vacunas recombinantes.....</i>	<b>31</b>
2.3 <i>Antígenos derivados del genoma: vacunología reversa.....</i>	<b>32</b>
2.4 <i>Vacunas basadas en OMVs de <i>Neisseria lactamica</i>.....</i>	<b>35</b>
<b>3. Proteínas de membrana externa y su papel en la patogenicidad</b> <b>del meningococo.....</b>	<b>37</b>
3.1 <i>Proteínas de autotransporte.....</i>	<b>38</b>
3.2 <i>Proteínas implicadas en la captación de metabolitos.....</i>	<b>40</b>
3.3 <i>Porinas.....</i>	<b>42</b>
3.4 <i>Proteínas de adherencia e invasión.....</i>	<b>45</b>
3.5 <i>Otras proteínas.....</i>	<b>47</b>
3.6 <i>Papel en el funcionamiento celular de las interacciones</i> <i>entre proteínas de membrana externa.....</i>	<b>51</b>
<b>Objetivos e interés del trabajo.....</b>	<b>53</b>
<b>CAPÍTULO I: Análisis del proteoma de membrana externa</b> <b>mediante electroforesis bidimensional IEF/SDS-PAGE.....</b>	<b>59</b>
<b>1. Introducción.....</b>	<b>61</b>
1.1 <i>Isoelectroenfoque.....</i>	<b>61</b>
<b>2. Material y métodos.....</b>	<b>67</b>
2.1 <i>Cepas bacterianas, origen, características, conservación y</i> <i>cultivo.....</i>	<b>67</b>

2.1.1	<u>Cepas bacterianas: Origen y características</u> .....	67
2.1.2	<u>Conservación</u> .....	69
2.1.3	<u>Condiciones de cultivo</u> .....	70
2.2	<i>Extracción de vesículas de membrana externa (OMVs)</i> .....	70
2.3	<i>Obtención y conservación de sueros</i> .....	72
2.3.1	<u>Obtención y conservación de sueros de ratón</u> .....	72
2.3.2	<u>Obtención y conservación de sueros de conejo</u> .....	73
2.3.3	<u>Otros sueros</u> .....	74
2.4	<i>Técnicas electroforéticas</i> .....	74
2.4.1	<u>Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)</u> ..	74
2.4.2	<u>Electroforesis bidimensional convencional (IEF/SDS-PAGE)</u> .....	75
2.5	<i>Electrotransferencia a membranas de PVDF</i> .....	76
2.6	<i>Inmunodetección</i> . ....	77
2.7	<i>Análisis informático de los datos</i> .....	78
2.8	<i>Identificación por MALDI-TOF</i> .....	79
<b>3.</b>	<b>Resultados</b> .....	<b>81</b>
3.1	<i>Electroforesis bidimensional en IEF/SDS-PAGE. Identificación por MALDI-TOF</i> .....	81
3.1.1	<u>Determinación de las condiciones óptimas de tiempo de IEF, solubilización y gradiente de pI</u> .....	81
3.1.2	<u>Análisis proteómico</u> .....	85
3.1.3	<u>Identificación por MALDI-TOF</u> .....	97
3.1.4	<u>Análisis santigénico</u> .....	102
<b>4.</b>	<b>Discusión</b> .....	<b>113</b>

<b>CAPÍTULO II: Análisis de los complejos de proteínas de membrana externa mediante electroforesis bidimensional diagonal dSDS-PAGE.....</b>	<b>119</b>
<b>1. Introducción.....</b>	<b>121</b>
1.1 <i>Electroforesis diagonal.....</i>	<b>121</b>
1.2 <i>Relevancia del estudio de complejos en el desarrollo de vacunas. Epitopos conformacionales y compartidos.....</i>	<b>123</b>
<b>2. Material y métodos.....</b>	<b>125</b>
2.1 <i>Cepas bacterianas, origen, características, conservación y cultivo.....</i>	<b>125</b>
2.2 <i>Extracción de vesículas de membrana externa (OMVs).....</i>	<b>125</b>
2.3 <i>Obtención y conservación de sueros.....</i>	<b>126</b>
2.4 <i>Electroforesis bidimensional diagonal.....</i>	<b>126</b>
2.5 <i>Electrotransferencia a membranas de PVDF.....</i>	<b>127</b>
2.6 <i>Inmunodetección.....</i>	<b>127</b>
<b>3. Resultados.....</b>	<b>129</b>
3.1 <i>Electroforesis bidimensional diagonal/SDS-PAGE.....</i>	<b>129</b>
3.1.1 <u>Análisis proteómico.....</u>	<b>129</b>
3.1.2 <u>Análisis antigénico.....</u>	<b>140</b>
<b>4. Discusión.....</b>	<b>145</b>
 <b>CAPÍTULO III: Análisis en condiciones nativas de los complejos de proteínas de membrana externa mediante electroforesis bidimensional Blue-Native/SDS- PAGE.....</b>	 <b>151</b>
<b>1. Introducción.....</b>	<b>153</b>
1.1 <i>Electroforesis Blue-Native.....</i>	<b>153</b>

1.2 Otras técnicas de estudio de complejos: Ventajas e inconvenientes.....	156
<b>2. Material y métodos.....</b>	<b>165</b>
2.1 Cepas bacterianas, origen, características, conservación y cultivo.....	165
2.2 Extracción de vesículas de membrana externa (OMVs).....	166
2.2.1 <u>Extracción de vesículas de membrana externa con prensa de French</u> .....	166
2.2.2 <u>Extracción de vesículas de membrana externa con deoxicolato sódico</u> .....	166
2.3 Electroforesis Blue Native (BN-PAGE).....	166
2.4 Electroforesis bidimensional BN/SDS-PAGE.....	168
2.5 Análisis informático de los datos.....	168
2.6 Identificación por MALDI-TOF.....	169
<b>3. Resultados.....</b>	<b>171</b>
3.1 Análisis de la primera dimensión: BN-PAGE.....	171
3.2 Análisis de la segunda dimensión: SDS-PAGE.....	172
3.3 Identificación por MALDI-TOF.....	182
3.4 Comparación de las técnicas 2D BN/SDS-PAGE y 2D dSDS-PAGE para el análisis de complejos de membrana externa de <i>N. meningitidis</i> .....	184
<b>4. Discusión.....</b>	<b>187</b>
 <b>Sinopsis. ....</b>	 <b>191</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>199</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>203</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS.

Página

<b>Figura 1:</b>	Comparación de las condiciones de solubilización de OMVs de <i>N. meningitidis</i> .....	83
<b>Figura 2:</b>	Comparación de las condiciones de rehidratación de las tiras IPG.....	84
<b>Figura 3:</b>	Electroforesis bidimensional en IEF/SDS-PAGE de OMVs de la cepa <i>N. meningitidis</i> 2851 (cepa salvaje 44/76).....	88
<b>Figura 4:</b>	Electroforesis bidimensional en IEF/SDS-PAGE de OMVs de la cepa <i>N. meningitidis</i> 3050 (2851 porA-).....	89
<b>Figura 5:</b>	Electroforesis bidimensional en IEF/SDS-PAGE de OMVs de la cepa <i>N. meningitidis</i> 3103 (2851 PorB-).....	89
<b>Figura 6:</b>	Electroforesis bidimensional en IEF/SDS-PAGE de OMVs de la cepa <i>N. meningitidis</i> 3043 (2851 FetA-).....	90
<b>Figura 7:</b>	Electroforesis bidimensional en IEF/SDS-PAGE de OMVs de la cepa <i>N. meningitidis</i> 2851 RmpM-.....	90
<b>Figura 8:</b>	Electroforesis bidimensional en IEF/SDS-PAGE de OMVs de la cepa <i>N. meningitidis</i> 3059 (cepa salvaje).....	91
<b>Figura 9:</b>	Electroforesis bidimensional en IEF/SDS-PAGE de OMVs de la cepa <i>N. meningitidis</i> 3091 (3059 PorA-).....	91
<b>Figura 10:</b>	Electroforesis bidimensional en IEF/SDS-PAGE de OMVs de la cepa <i>N. meningitidis</i> 3094 (3059 PorB-).....	92
<b>Figura 11:</b>	Electroforesis bidimensional en IEF/SDS-PAGE de OMVs de la cepa <i>N. meningitidis</i> B16B6.....	92
<b>Figura 12:</b>	Electroforesis bidimensional en IEF/SDS-PAGE de OMVs de la cepa <i>N. meningitidis</i> Nm30.....	93
<b>Figura 13:</b>	Electroforesis bidimensional en IEF/SDS-PAGE de OMVs de la cepa <i>N. meningitidis</i> M982.....	93
<b>Figura 14:</b>	Electroforesis bidimensional en IEF/SDS-PAGE de OMVs de la cepa <i>N. lactamica</i> NIP0.....	95
<b>Figura 15:</b>	Electroforesis bidimensional en IEF/SDS-PAGE de OMVs de la cepa <i>N. lactamica</i> NIP2.....	96
<b>Figura 16:</b>	Electroforesis bidimensional en IEF/SDS-PAGE de OMVs de la cepa <i>N. lactamica</i> NIP5.....	96
<b>Figura 17:</b>	Puntos comunes a todas las cepas de (A) <i>N. meningitidis</i> (B) <i>N. lactamica</i> y (C) entre ambas especies. ....	97
<b>Figura 18:</b>	Proteínas identificadas por MALDI-TOF tras IEF/SDS-PAGE de OMVs de la cepa <i>N. meningitidis</i> B16B6. La identificación de los puntos más relevantes se llevó a cabo mediante análisis MALDI-TOF.....	98
<b>Figura 19:</b>	Proteínas identificadas por MALDI-TOF en una electroforesis bidimensional en IEF/SDS-PAGE realizada con OMVs de la cepa <i>N. lactamica</i> NIP2.....	100
<b>Figura 20:</b>	Western-blot de la cepa <i>N. meningitidis</i> B16B6 incubada con suero anti-PorA 9-1-P1.c.....	103
<b>Figura 21:</b>	Western-blot de la cepa <i>N. meningitidis</i> B16B6 tras incubación secuencial con suero anti-PorA 9-1-P1.c y anti-RmpM.....	103
<b>Figura 22:</b>	Western-blot de la cepa <i>N. meningitidis</i> B16B6 tras incubación secuencial con suero anti-PorA 9-1-P1.c, anti-RmpM y anti-P47.....	104
<b>Figura 23:</b>	Western-blot de la cepa <i>N. meningitidis</i> B16B6 tras incubación secuencial con suero anti-PorA 9-1-P1.c, anti-RmpM , anti-P47 y anti-B16B6.....	104

<b>Figura 24:</b>	Western-blot de la cepa <i>N. meningitidis</i> Nm30 incubada con suero anti-PorA	106
<b>Figura 25:</b>	Western-blot de la cepa <i>N. meningitidis</i> Nm30 tras incubación secuencial con suero anti-PorA y anti-RmpM.....	107
<b>Figura 26:</b>	Western-blot de la cepa <i>N. meningitidis</i> Nm30 tras incubación secuencial con suero anti-PorA, anti-RmpM y anti-Nm30.....	107
<b>Figura 27:</b>	Western-blot de la cepa <i>N. lactamica</i> NIP2 incubada con suero anti-RmpM..	108
<b>Figura 28:</b>	Western-blot de la cepa <i>N. lactamica</i> NIP2 incubada secuencialmente con suero anti-RmpM y anti-P47.....	109
<b>Figura 29:</b>	Western-blot de la cepa <i>N. lactamica</i> NIP2 incubada secuencialmente con suero anti-RmpM, anti-P47 y anti-NIP2.....	109
<b>Figura 30:</b>	Western-blot de la cepa <i>N. lactamica</i> NIP5 incubada con suero anti-RmpM...	110
<b>Figura 31:</b>	Western-blot de la cepa <i>N. lactamica</i> NIP5 incubada secuencialmente con suero anti-RmpM y anti-NIP5.....	110
<b>Figura 32:</b>	Mapas inmunoproteómicos de los antígenos de membrana externa de las cepas de <i>N. meningitidis</i> B16B6 (A) y Nm30 (B) y de las cepas de <i>N. lactamica</i> NIP2 (C) y NIP5 (D).....	112
<b>Figura 33:</b>	Análisis en dSDS-PAGE de OMVs de la cepa <i>N. meningitidis</i> M982 tras el tratamiento previo a la segunda dimensión a 37°C (A) o a 95° 10 min. (B).....	131
<b>Figura 34:</b>	Electroforesis bidimensional diagonal/SDS-PAGE de OMVs de la cepa <i>N. meningitidis</i> 2851 tras el tratamiento de los geles procedentes de la primera dimensión a 95°C durante 10 min.....	132
<b>Figura 35:</b>	Electroforesis bidimensional diagonal/SDS-PAGE de OMVs de la cepa <i>N. meningitidis</i> 3059 tras el tratamiento de los geles procedentes de la primera dimensión a 95°C durante 10 min.....	133
<b>Figura 36:</b>	Electroforesis bidimensional diagonal/SDS-PAGE de OMVs de la cepa <i>N. meningitidis</i> B16B6 tras el tratamiento de los geles procedentes de la primera dimensión a 95°C durante 10 min.....	134
<b>Figura 37:</b>	Electroforesis bidimensional diagonal/SDS-PAGE de OMVs de la cepa <i>N. meningitidis</i> Nm30 tras el tratamiento de los geles procedentes de la primera dimensión a 95°C durante 10 min.....	135
<b>Figura 38:</b>	Electroforesis bidimensional diagonal/SDS-PAGE de OMVs de las cepas mutantes Knock-out de <i>N. meningitidis</i> 2851 tras el tratamiento de los geles procedentes de la primera dimensión a 95°C durante 10 min.....	137
<b>Figura 39:</b>	Electroforesis bidimensional diagonal/SDS-PAGE de OMVs de las cepas mutantes Knock-out de <i>N. meningitidis</i> 3059 tras el tratamiento de los geles procedentes de la primera dimensión a 95°C durante 10 min.....	138
<b>Figura 40:</b>	Análisis en dSDS-PAGE de OMVs de la cepa <i>N. lactamica</i> NIP3 tras el tratamiento previo a la segunda dimensión a 37°C (A) o a 95° 10 min. (B).....	139
<b>Figura 41:</b>	Electroforesis bidimensional diagonal/SDS-PAGE de OMVs de la cepa <i>N. lactamica</i> NIP2 tras el tratamiento de los geles procedentes de la primera dimensión a 95°C durante 10 min.....	140
<b>Figura 42:</b>	Western-blots de las proteínas antigénicas de membrana externa separadas mediante dSDS-PAGE previo tratamiento de las tiras de la primera dimensión a temperatura ambiente (A y B) o a 95°C 10 min. (C y D).....	142
<b>Figura 43:</b>	Incubación secuencial de OMVs de la cepa M982 separadas mediante dSDS-PAGE previo tratamiento de las tiras de la primera dimensión a temperatura	

	ambiente con los anticuerpos monoclonales anti-opa (A) anti-PorA (B), anti-PorB (C) y anti-RmpM (D).....	143
<b>Figura 44:</b>	Incubación secuencial de OMVs de la cepa M982 separadas mediante dSDS-PAGE con los anticuerpos monoclonales anti-Opa (A) anti-PorA (B), anti-PorB (C) y anti-RmpM (D).....	144
<b>Figura 45:</b>	Análisis por BN-PAGE de complejos proteicos de membrana externa de las cepas de <i>Neisseria meningitidis</i> 2851 y sus mutantes en PorA, PorB, RmpM y FetA; 3059 y sus mutantes en PorA y PorB; <i>N. meningitidis</i> B16B6, M982 y Nm30 y de las cepas de <i>N. lactamica</i> NIP0, NIP2 y NIP5.....	171
<b>Figura 46:</b>	Electroforesis 2D en BN/SDS-PAGE de OMVs de la cepa <i>N. meningitidis</i> 2851.....	174
<b>Figura 47:</b>	Electroforesis 2D en BN/SDS-PAGE de OMVs de las cepas mutantes Knock-out de <i>N. meningitidis</i> 2851.....	175
<b>Figura 48:</b>	Electroforesis 2D en BN/SDS-PAGE de OMVs de la cepa <i>N. meningitidis</i> 3059.....	176
<b>Figura 49:</b>	Electroforesis 2D en BN/SDS-PAGE de OMVs de las cepas mutantes Knock-out de <i>N. meningitidis</i> 3059.....	176
<b>Figura 50:</b>	Electroforesis 2D en BN/SDS-PAGE de OMVs de la cepa <i>N. meningitidis</i> B16B6.....	177
<b>Figura 51:</b>	Electroforesis 2D en BN/SDS-PAGE de OMVs de la cepa <i>N. meningitidis</i> Nm30.....	178
<b>Figura 52:</b>	Electroforesis 2D en BN/SDS-PAGE de OMVs de la cepa <i>N. meningitidis</i> M982.....	179
<b>Figura 53:</b>	Electroforesis 2D en BN/SDS-PAGE de OMVs de la cepa <i>N. lactamica</i> NIP0.....	180
<b>Figura 54:</b>	Electroforesis 2D en BN/SDS-PAGE de OMVs de la cepa <i>N. lactamica</i> NIP2.....	180
<b>Figura 55:</b>	Electroforesis 2D en BN/SDS-PAGE de OMVs de la cepa <i>N. lactamica</i> NIP5.....	181
<b>Figura 56:</b>	Proteínas identificadas por MALDI-TOF en una electroforesis bidimensional en BN/SDS-PAGE realizada con OMVs de la cepa 2851.....	182
<b>Figura 57:</b>	Comparación de los resultados obtenidos al analizar la cepa 2851 y sus mutantes para las proteínas PorA, PorB, RmpM y FetA mediante electroforesis bidimensional BN/SDS-PAGE y electroforesis bidimensional diagonal.....	185

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b>	Vacunas antimeningocócicas disponibles en la actualidad.....	20
<b>Tabla 2:</b>	Línea temporal del proceso de desarrollo de vacunas meningocócicas.....	21
<b>Tabla 3:</b>	Características de las cepas estudiadas en el CAPÍTULO I.....	69
<b>Tabla 4:</b>	Dilución de los sueros utilizados. ....	78
<b>Tabla 5:</b>	Composición detallada de los tampones de solubilización utilizados.....	84
<b>Tabla 6:</b>	Número de puntos detectados en mapas bidimensionales de distintas cepas de <i>N. meningitidis</i> y <i>N. lactamica</i> .....	85
<b>Tabla 7:</b>	Porcentaje de puntos coincidentes entre las cepas mutantes de <i>N. meningitidis</i> y la cepa salvaje correspondiente.....	87
<b>Tabla 8:</b>	Resultados obtenidos para la búsqueda en MASCOT tras el análisis de los puntos relevantes de la cepa <i>N. meningitidis</i> B16B6.....	99

<b>Tabla 9:</b>	Resultados obtenidos para la búsqueda en MASCOT tras el análisis de los puntos relevantes de la cepa <i>N. lactamica</i> NIP2.....	101
<b>Tabla 10:</b>	Características de las cepas estudiadas en el CAPÍTULO II.....	125
<b>Tabla 11:</b>	Características de las cepas estudiadas en el CAPÍTULO III.....	165
<b>Tabla 12:</b>	Resultados obtenidos para la búsqueda en MASCOT tras el análisis de OMVs de la cepa <i>N. meningitidis</i> 2851.....	183

## ÍNDICE DE GRÁFICAS.

<b>Gráfica 1:</b>	Porcentaje de puntos coincidentes en las cepas de <i>N. lactamica</i> , NIP0, NIP2 y NIP5.....	94
-------------------	--	----



<b>AAH</b>	ácido 6-aminohexanoico
<b>dSDS-PAGE</b>	electroforesis bidimensional diagonal
<b>BCA</b>	bicinchonic acid (ácido bicinconínico)
<b>BSA</b>	bovine seroalbumin (seroalbúmina bovina)
<b>BN-PAGE</b>	electroforesis "Blue Native"
<b>BN/SDS-PAGE</b>	electroforesis bidimensional "Blue Native"/SDS-PAGE
<b>CBB</b>	Coomassie Brilliant Blue G- 250
<b>CHAPS</b>	3-[(3-colamidopropil)-dimtilamonio]-1 -propanosulfonato
<b>CN-PAGE</b>	electroforesis "clear-native"
<b>CPS</b>	capsular polysaccharide (polisacárido capsular de alto peso molecular)
<b>DDM</b>	n-dodecyl- $\beta$ -D-maltosido
<b>Desferal</b>	deferroxamina mesilato
<b>DTT</b>	dithiothreitol
<b>EDTA</b>	sal sódica del ácido etilendiaminotetraacético
<b>ETs</b>	electrophoretic types (tipos electroforéticos)
<b>FCCS</b>	fluorescence cross-correlation spectroscopy (espectroscopia de correlación cruzada de fluorescencia)
<b>FCS</b>	fluorescence correlation spectroscopy (espectroscopia de correlación de fluorescencia)
<b>FF-IEF</b>	free-flow isoelectrofocusing (isoelectroenfoque de flujo libre)
<b>FRET</b>	fluorescencia por transferencia de energía resonante
<b>Hb</b>	hemoglobina
<b>IEF</b>	isoelectroenfoque
<b>IEF/SDS-PAGE</b>	electroforesis bidimensional convencional
<b>IPG</b>	geles con un gradiente de pH inmovilizado
<b>LPS</b>	lipopolisacárido
<b>MALDI</b>	matrix assisted laser desorption ionization
<b>MLST</b>	multilocus sequence typing
<b>OMP</b>	outer membrane protein (proteínas de membrana externa)
<b>OMV</b>	outer membrane vesicles (vesículas de membrana externa)
<b>Opa</b>	opacity protein (proteína de opacidad)
<b>ORFs</b>	open reading frames (marcos de lectura abierta)
<b>PAGE</b>	electroforesis en geles de poliacrilamida
<b>PBS</b>	phosphate buffer saline (tampon fosfato salino)
<b>PCR</b>	polimerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
<b>pI</b>	punto isoeléctrico
<b>Pm</b>	peso molecular
<b>PorA</b>	porina A
<b>PorB</b>	porina B

<b>PVDF</b>	polyvinilidene difluoride (difluoruro de polivinilideno)
<b>RmpM</b>	reduction modifiable protein M (proteína M modificable por reducción)
<b>SB 3-10</b>	N-decil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propano-sulfonato
<b>SDS</b>	sodium dodecyl sulfate (dodecil-sulfato sódico)
<b>SPR</b>	surface plasmon resonance (resonancia de plasmón superficial )
<b>TAP-tag</b>	tandem affinity purification tag (purificación por afinidad en tándem)
<b>TBS</b>	Tris buffer saline (tampon Tris salino)
<b>TCA</b>	trichloroacetic acid (ácido tricloroacético)
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-tetraetilendiamina
<b>TOF</b>	time of flight (analizador tipo tiempo de vuelo)

## **Antecedentes bibliográficos**



## Antecedentes bibliográficos.

### 1 *Neisseria meningitidis* como patógeno

El Bergey's Manual of Systematic Bacteriology ubica a *Neisseria meningitidis* dentro del género *Neisseria*, situado en la clase  $\beta$  del *phylum* proteobacterias, que engloba bacterias caracterizadas por una morfología, fisiología y metabolismo muy variables. *N. meningitidis* es un diplococo Gram-negativo de tamaño comprendido entre 0,6 y 1  $\mu\text{m}$  de diámetro. Esta especie comprende bacterias no móviles carentes de flagelos que pueden presentar cápsulas y *pili*, pero no endosporas. Aunque son microorganismos aerobios, su crecimiento se ve favorecido por concentraciones de  $\text{CO}_2$  del 5-10%, una humedad relativa del 50%, una temperatura de crecimiento de 35-37% y un pH entre 7,4 y 7,6.

Todos los meningococos patógenos presentan una cápsula externa de naturaleza polisacáridica anclada a su membrana externa cuyas características inmunoquímicas permiten diferenciar 13 serogrupos diferentes, de los que los serogrupos A, B, C, Y, W135 son los responsables del 90% de los casos de enfermedad meningocócica a nivel global. La clasificación contempla además la existencia de 20 serotipos, definidos por las proteínas de membrana externa (OMP) de clase 2 y 3,<sup>1</sup> 10 subtipos determinados por las OMP de clase 1, y 13 inmutipos en base a sus antígenos lipooligosacáridicos.<sup>2</sup>

---

<sup>1</sup> Frasch CE, Zollinger WD, Poolman JT. Serotype antigens of *Neisseria meningitidis* and a proposed scheme for designation of serotypes. *Rev Infect Dis.* 1985; 7: 504–510.

<sup>2</sup> Scholten RJ, Kuipers B, Valkenburg HA, Dankert J, Zollinger WD, et al. Lipooligosaccharide immunotyping of *Neisseria meningitidis* by a whole-cell ELISA with monoclonal antibodies. *J Med Microbiol.* 1994; 41: 236–243.

En la última década, el uso de métodos de subtipado molecular<sup>3</sup> ha permitido clasificar a la bacteria en diferentes tipos electroforéticos (ETs), que posibilitan la monitorización de la epidemiología global de la enfermedad meningocócica. Se ha descrito la capacidad del meningococo de modificar los genes que codifican para su cápsula (*capsular switching*),<sup>4</sup> lo cual podría constituir un importante mecanismo de evasión de la respuesta inmune que ya ha sido descrito en otros patógenos encapsulados.

*N. meningitidis* coloniza de forma habitual las membranas de la mucosa orofaríngea humana, donde normalmente se comporta como comensal. En condiciones no epidémicas, entre un 5% y un 10% de la población pueden ser portadores asintomáticos. La transmisión de *N.meningitidis* se produce por la vía aérea superior mediante contacto directo con secreciones nasales o aerosoles procedentes de dichos portadores. La enfermedad meningocócica es un suceso relativamente raro<sup>5</sup> que se desarrolla cuando el meningococo penetra en el epitelio de la mucosa y de él pasa al torrente sanguíneo, donde sobrevive y se multiplica, lo que provoca una bacteriemia que puede ir acompañada de meningitis, de sépsis o de ambas.<sup>6</sup> La enfermedad meningocócica invasiva se caracteriza por provocar una alta tasa de mortalidad, de aproximadamente un 10%, pudiendo exceder el 35% en presencia de

---

<sup>3</sup> Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, *et al.* Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms.

*Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95: 3140–3145.

<sup>4</sup> Stwartlwey J, Marfin A, Edupuganti S, Liu L, Cieslak P *et al.* Capsule switching of *Neisseria meningitidis* in children. *Infect Immun.* 1999; 67: 2449–2451.

<sup>5</sup> Aycock WL, Mueller JH. Meningococcus carrier rates and meningitis incidence. *Bacteriol Rev* 1950; 14: 115–160.

<sup>6</sup> Gold R. Clinical aspects of meningococcal disease. En: *Evolution of meningococcal disease*. Vedros NA. (Ed). Vol 2, págs. 69–97. 1987. Crc Pr I Llc. Boca Ratón. Florida.

shock séptico.<sup>7</sup> Además, entre el 15 y el 20% de los supervivientes sufren secuelas neurológicas tales como sordera o retraso mental.<sup>8</sup> En Europa, las mayores tasas de enfermedad meningocócica sistémica se encuentran en niños menores de 5 años<sup>9,10</sup> y en adolescentes,<sup>11</sup> mientras que el mayor porcentaje de portadores se da entre los adultos jóvenes.

Los meningococos del serogrupo A son la causa principal de enfermedad meningocócica endémica y epidémica en África, con mayor incidencia en el área subsahariana que va de Senegal a Etiopía conocida como “cinturón subsahariano de la meningitis”. Las epidemias de este serogrupo siguen ciclos irregulares de 5-12 años, con una duración de 2 a 3 años y marcada estacionalidad. En períodos epidémicos la tasa de incidencia puede llegar a 1.000/100.000, con una tasa de mortalidad es del 10 al 20%. En esta zona, la incidencia en épocas no epidémicas también es alta, 30/100.000, unas 10 veces mayor que en Europa, lo que unido a la reciente emergencia de los serogrupos W135 y X<sup>12</sup> como causa de enfermedad epidémica en la región,<sup>13,14</sup> la convierte en una de las zonas más complejas desde el punto de vista epidemiológico.<sup>15</sup>

<sup>7</sup> van Deuren M, Brandtzaeg P, van der Meer JW. Update on meningococcal disease with emphasis on pathogenesis and clinical management. *Clin Microbiol Rev.* 2000; 13: 144–166.

<sup>8</sup> Healy C.J, Baker C.M. The future of meningococcal vaccines. *The Pediatric Infectious Disease Journal.* 2005; 24: 175–176.

<sup>9</sup> Goldschneider I, Gotschlich EC, Artenstein MS. Human immunity to the meningococcus. I. The role of humoral antibodies. *J Exp Med.* 1969; 129: 1307–1326.

<sup>10</sup> Moore PS, Reeves MW, Schwartz B, Gellin BG, Broome CV. Intercontinental spread of an epidemic group A *Neisseria meningitidis* strain. *Lancet* 1989; 2: 260–263.

<sup>11</sup> Connolly M, Noah M. Is group C meningococcal disease increasing in Europe? A report of surveillance of meningococcal infection in Europe 1993–6. European Meningitis Surveillance Group. *Epidemiol Infect.* 1999; 122: 41–49

<sup>12</sup> Boiesier P, Nicolas P, Djibo S, Taha MK, Jeanne I *et al.* Meningococcal meningitis: unprecedented incidence of serogroup X-related cases in 2006 in Niger. *Clin Infect Dis.* 2007; 44: 657–663

<sup>13</sup> Wilder-Smith A, Barkham TM, Earnest A, Paton NI. Acquisition of W135 meningococcal carriage in Hajj pilgrims and transmission to household contacts: prospective study. *BMJ.* 2002; 325: 365–366.

El serogrupo B es la principal causa de meningitis endémica en los países industrializados, siendo responsable de un 80% de los casos registrados en Europa, donde la mayor parte del resto de los casos se deben a cepas del serogrupo C<sup>16</sup>, y de un 30%-40% de los casos en Norteamérica, donde los demás se deben a los serogrupos C e Y en la misma proporción.<sup>17</sup> En todos estos países, la incidencia de los serogrupos B y C es mayor en invierno en niños de menos de 1 año. El serogrupo B también puede causar epidemias severas y persistentes, como las sufridas en ciertos países latinoamericanos (Cuba, Colombia, Brasil y Chile), Noruega o Nueva Zelanda.<sup>18</sup> La incidencia anual del serogrupo B es del orden de 20.000 a 80.000 casos por año, siendo responsable de 2.000 a 8.000 muertes.<sup>19</sup> En los países industrializados, debido a la práctica eliminación de las enfermedades provocadas por *N. meningitidis* serogrupos A y C mediante campañas de vacunación sistemáticas, la enfermedad meningocócica por serogrupo B ha pasado a ser una de las causas de muerte por infección más importantes durante la infancia.

---

<sup>14</sup> **Mayer LW, Reeves MW, Al-Hamdan N, Sacchi CT, Taha MK et al.** Outbreak of W135 meningococcal disease in 2000: not emergence of a new W135 strain but clonal expansion within the electrophoretic type-37 complex. *J Infect Dis.* 2002; 185: 1596–1605.

<sup>15</sup> **Teyssou R, Muros-Le Rouzic E.** Meningitis epidemics in Africa: a brief overview. *Vaccine.* 2007; 3: A3–A7.

<sup>16</sup> **Tzanakaki G, Mastrantonio P.** Aetiology of bacterial meningitis and resistance to antibiotics of causative pathogens in Europe and in the Mediterranean region. *Int J Antimicrob Agents.* 2007; 29: 621–629.

<sup>17</sup> **Rosenstein NE, Perkins BA, Stephens DS, Lefkowitz L, Cartter ML et al.** The changing epidemiology of meningococcal disease in the United States, 1992–1996. *J Infect Dis.* 1999; 180: 1894–1901.

<sup>18</sup> **Dyet K, Devoy A, McDowell R, Martin D.** New Zealand's epidemic of meningococcal disease described using molecular analysis: implications for vaccine delivery. *Vaccine.* 2005; 23: 2228–2230.

<sup>19</sup> **Girard MP, Preziosi MP, Aguado MT, Kieny MP.** A review of vaccine research and development: meningococcal disease. *Vaccine.* 2006; 24: 4692–4700.



## 2 Tendencias actuales en vacunas anti-serogrupo B

La enfermedad causada por los meningococos de los serogrupos A, C, Y y W135 se puede prevenir mediante el uso de vacunas basadas en polisacárido capsular de alto peso molecular (CPS).<sup>20</sup> Desafortunadamente, este tipo de vacunas no inducen respuesta inmune T-dependiente, son poco efectivas en lactantes y niños de corta edad y no generan una memoria inmune a largo plazo. La conjugación química del CPS a un transportador proteico asegura que se produzca una respuesta de este tipo,<sup>21</sup> de modo que ha sido ampliamente utilizada para la elaboración de vacunas contra estos serogrupos (**tabla 1**). Esta aproximación no es válida para el serogrupo B, pues su cápsula está formada por ácido  $\alpha$ -2,8 N-acetilneuramínico, que es estructural y antigénicamente idéntico al presente en los glicopéptidos polisiálicos de las neuronas fetales humanas, así como en ciertos tejidos nerviosos del adulto,<sup>22</sup> lo que evita que la cápsula sea reconocida por el sistema inmune debido a los mecanismos de autotolerancia del huésped. La perspectiva de desarrollar una vacuna universal contra este serogrupo continúa siendo remota, si bien en los últimos años se han realizado una serie de avances (**tabla 2**) debidos fundamentalmente a la aplicación de la tecnología de vacunología reversa.<sup>23,24,25</sup> Actualmente se están estudiando una serie de candidatos a vacuna contra el serogrupo B<sup>19,26,27</sup> que se citan en la **tabla 2**.

<sup>20</sup> Gotschlich EC, Goldschneider I, Artenstein MS. Human immunity to the meningococcus. V. The effect of immunization with meningococcal group C polysaccharide on the carrier state. *J Exp Med.* 1969; 129: 1385–1395.

<sup>21</sup> Robbins JB, Schneerson R, Vann WF, Bryla DA, Fattom A. Prevention of systemic infections caused by group B streptococcus and *Staphylococcus aureus* by multivalent polysaccharide-protein conjugate vaccines. *Ann N Y Acad Sci.* 1995. 31; 754: 68–82.

<sup>22</sup> Finne J, Leinonen M, Makela PH. Antigenic similarities between brain components and bacteria causing meningitis: implications for vaccine development and pathogenesis. *Lancet.* 1982; 2: 355–357

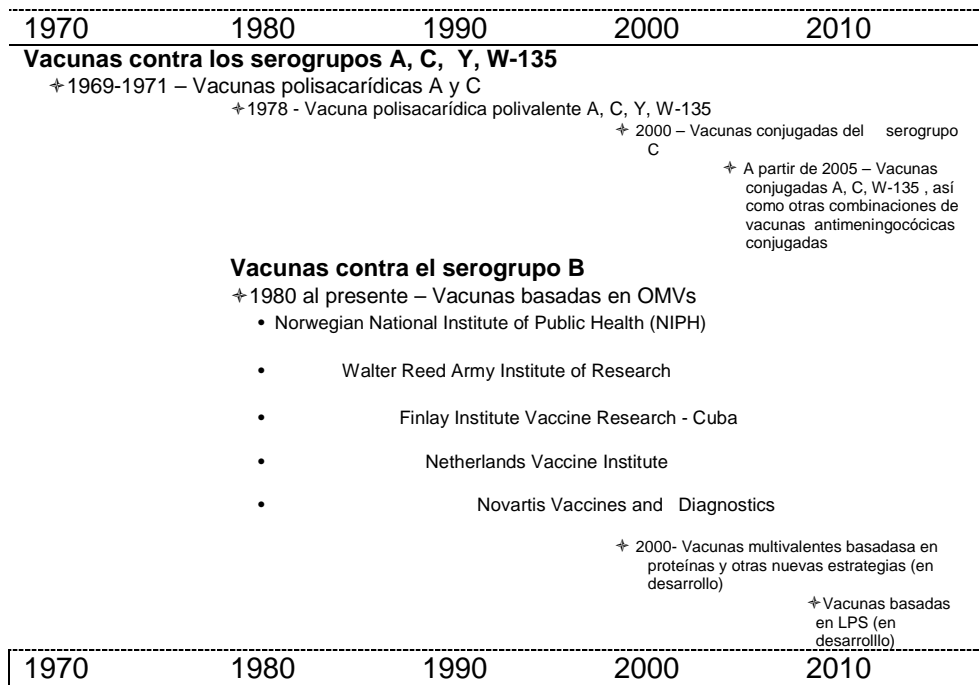
<sup>23</sup> Rappuoli R. Reverse vaccinology, a genome-based approach to vaccine development. *Vaccine.* 2001; 19: 2688–2691.

**Tabla 1:** Vacunas antimeningocócicas disponibles en la actualidad.

	Serogrupos
Vacunas Polisacáridicas	
Menomune® (Sanofi-Pasteur)	A, C, Y y W-135
ACWY Vax (GlaxoSmithKline)	A, C, Y y W-135
Mengiva A+C ® (Sanofi-Pasteur)	A, C
AC Vax ® (GlaxoSmithKline)	A, C
Vacuna Trivalente ACW (GlaxoSmithKline)	A, C y W-135
Vacunas Polisacáridicas conjugadas	
Meningitec® (Wyeth)	C conjugadada a CRM <sub>197</sub>
Menjugate® (Novartis)	C conjugadada a CRM <sub>197</sub>
NeisVac-C ® (Baxter)	C conjugadada a toxoide tetánico
Nuevas vacunas conjugadas	
Menactra (MCV4) (Sanofi-Pasteur)	A, C, Y, W-135 CRM <sub>197</sub>
DTPvvhB/HibMenAC (GlaxoSmithKline)	A, C + toxoide tetánico
(MVA) en desarrollo	A conjugada
(Novartis) en desarrollo	A, C, Y W-135 conjugada
Vacunas Basadas en OMVs	
VA-MENGOC-BC ®	OMVS de la cepa B:4:P1.19,15+C+OMPs
MeNZ B® (Chiron)	OMVS de la cepa B:4:P1.7 b,4

- <sup>24</sup> **Rappuoli R.** From Pasteur to genomics: progress and challenges in infectious diseases. *Nat Med.* 2004; 10: 1177–1185.
- <sup>25</sup> **Kelly DF, Rappuoli R.** Reverse vaccinology and vaccines for serogroup B *Neisseria meningitidis*. *Adv Exp Med Biol.* 2005; 568: 217–223.
- <sup>26</sup> **Morley SL, Pollard AJ.** Vaccine prevention of meningococcal disease, coming soon? *Vaccine.* 2001; 20: 666–687.
- <sup>27</sup> **Jódar L, Feavers IM, Salisbury D, Granoff DM.** Development of vaccines against meningococcal disease. *Lancet.* 2002; 359: 1499–1508

**Tabla 2:** Línea temporal del proceso de desarrollo de vacunas meningocócicas (tomada de **Stephens, DS.** 2007. Conquering the meningococcus. *FEMS microbiol rev.* 31: 3-14).



La incidencia de la enfermedad provocada por el serogrupo B es dependiente de la edad y se ha relacionado inversamente con la presencia de anticuerpos bactericidas, lo que indica la importancia de este tipo de anticuerpos en la lucha contra la infección por meningococos de este grupo.<sup>28</sup> A diferencia de lo que ocurre en los serogrupos A y C, los anticuerpos bactericidas están dirigidos principalmente contra antígenos no capsulares como proteínas de membrana externa (OMPs) y lipopolisacárido (LPS), de manera que estos componentes de la membrana externa se han estudiado como posibles candidatos para la elaboración de

<sup>28</sup> **Goldeneider I, Gotslich EC, Artenstein MS.** Human immunity in the meningococcus I. The role of humoral antibodies. *J Exp Med.* 1969; 129: 1307–1326.

una vacuna. El principal problema con este tipo de vacunas es la heterogeneidad antigénica de las OMPs, que implica que su éxito no pueda ir más allá de la cepa empleada en su desarrollo, existiendo así lo que se conoce como restricción de cepa.<sup>29</sup> Además, este tipo de vacunas son poco inmunogénicas en los niños de corta edad<sup>30</sup> y generan una respuesta inmune de corta duración. A pesar de todo se considera que estas vacunas monovalentes podrían ser adecuadas en el caso de enfermedad hiperendémica del serogrupo B en la que sólo esté implicado un tipo antigénico.<sup>31</sup>

Se han empleado diferentes estrategias para incrementar el número de cepas cubiertas por las vacunas basadas en OMPs. Normalmente radican en el uso de combinaciones de múltiples tipos antigénicos, si bien el principal objetivo es encontrar un antígeno o grupo de antígenos comunes a todas las cepas del serogrupo B y capaces de inducir una respuesta inmune protectora de larga duración tanto en niños como en adultos.

Otro problema en el desarrollo de una vacuna contra el serogrupo B es la falta de evidencia de una protección adecuada, ya que, así como en las vacunas frente a los grupos A y C se ha observado relación directa entre la generación de anticuerpos bactericidas y protección, esta no se ha podido evidenciar en el caso de las vacunas contra el serogrupo B. De hecho se ha sugerido que la protección contra la infección por meningococo B puede deberse también a la presencia de anticuerpos

---

<sup>29</sup> **Tappero JW, Lagos R, Ballesteros AM, Plikaytis B, Williams D et al.** Immunogenicity of two serogroup B outer-membrane protein meningococcal vaccines: a randomized controlled trial in Chile. *JAMA*. 1999; 281: 1520–1527.

<sup>30</sup> **Carbonare SB, Arsianian C, Silva ML, Farhat CK, Carneiro-Sampaio MM.** The antimeningococcal vaccine VAMENGOC B-C induced poor serum and salivary antibody response in young Brazilian children. *Pediatr Infect Dis J*. 1995; 14: 797–803.

<sup>31</sup> **Rodríguez AP, Dickinson F, Baly A, Martínez R.** The epidemiological impact of antimeningococcal B vaccination in Cuba. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999; 94: 433–40.

opsónicos y a respuestas inmunes innatas.<sup>32</sup> Es más, se ha propuesto que los ensayos de actividad opsónica y actividad bactericida de sangre completa serían marcadores de protección más apropiados que los ensayos de actividad bactericida de suero utilizados actualmente.

Una vacuna capaz de dirigir la respuesta inmune contra el polisacárido capsular B podría ser la solución más sencilla para la obtención de una vacuna anti-B, puesto que este antígeno es compartido por todos los miembros del serogrupo. Desafortunadamente, la cápsula es poco inmunogénica debido a la tolerancia inmunológica ya comentada, pero la conjugación covalente del polisacárido B a una proteína transportadora parece convertirlo en un antígeno T- dependiente que es capaz de inducir respuesta de tipo IgG, incrementando tanto los títulos de anticuerpos como la actividad bactericida en estudios llevados a cabo en animales, si bien la mayor parte de los anticuerpos están dirigidos contra un epitopo sintético originado por el proceso de conjugación más que contra el polisacárido en sí.<sup>33</sup>

En un intento por superar este problema, Jennings y colaboradores desarrollaron un polisacárido modificado químicamente que contiene grupos N-propionil en vez de N-acetil en la posición C5 de los residuos de ácido siálico. Las vacunas desarrolladas mostraron resultados muy

---

<sup>32</sup> **Ison CA, Anwan N, Coie MJ, Galassini R, Heyderman RS et al.** Assessment of immune response of meningococcal disease : comparison of whole-blood assay and the serum bactericidal assay. *Microbiol Pathol.* 1999; 27: 207–214.

<sup>33</sup> **Bartolini A, Norelli F, Ceccarini C, Rappouli R, Constantino P.** Immunogenicity of meningococcal B polysaccharide conjugated to tetanus toxoid or CRM197 via adipic acid dihydrazide. *Vaccine.* 1995; 13: 463–470.

prometedores en ratones<sup>34</sup> y primates no humanos,<sup>35</sup> pero en un ensayo de fase I realizado en adultos voluntarios se comprobó que los anticuerpos inducidos carecen de actividad funcional.<sup>36</sup>

## 2.1 Vacunas basadas en OMVs, proteínas mayoritarias, proteínas de unión a hierro

En la década de los 70 se intentó producir vacunas basadas en OMPs sin LPS (utilizando detergentes y posterior precipitación con cloruro de sodio) y a pesar de los prometedores resultados obtenidos en estudios con animales, estas vacunas no indujeron producción de anticuerpos bactericidas ni en niños ni en adultos.<sup>37</sup> La ausencia de este tipo de anticuerpos se atribuyó a la pérdida de la estructura terciaria de la proteína que acompañaba a la precipitación, por lo que el siguiente paso fue producir una vacuna en la que las proteínas estuviesen dispuestas en su conformación nativa, en forma de vesículas de membrana externa<sup>38</sup> similares a las producidas de modo normal por el meningococo durante su crecimiento.<sup>39</sup>

---

<sup>34</sup> **Jennings HJ, Roy R, Gamian A.** Induction of meningococcal group B polysaccharide-specific IgG antibodies in mice using N-propionolated B polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine. *J. Immunol.* 1986; 137: 1708–1713

<sup>35</sup> **Fusci PC, Michon F, Tai JY, Blake MS.** Preclinical evaluation of a novel group B meningococcal conjugate vaccine that elicits bactericidal activity in both mice and non human primates. *J Infect Dis.* 1997; 175: 364–372.

<sup>36</sup> **Bruge J, Bouveret-Le Cam N, Danve B, Rougon G, Schulz D.** Clinical evaluation of a group B meningococcal N-propionylated polysaccharide conjugate vaccine in adult, male volunteers. *Vaccine.* 2004; 22: 1087–1096.

<sup>37</sup> **Zollinger WD, Mandrell RE, Altieri P, Berman S, Lowenthal J et al.** Safety and immunogenicity of a *Neisseria meningitidis* type 2 protein vaccine in mammals and humans. *J Infect Dis* 1978; 137: 728–739.

<sup>38</sup> **Wang LY, Frasci CE.** Development of a *Neisseria meningitidis* group B serotype 2b protein vaccine and evaluation in a mouse model. *Infect Immun.* 1984; 46: 404–408.

<sup>39</sup> **Devoe IW, Gilchrist JE.** Release of endotoxin in the form of cell wall blebs during in vitro growth of *Neisseria meningitidis*. *J Exp Med.* 1973; 138: 1156–1167

En estas nuevas vacunas, la eliminación de los LPS se realizó selectivamente utilizando únicamente detergentes<sup>40</sup> y añadiendo en algunos casos polisacáridos para aumentar la solubilidad. Las vacunas obtenidas resultaron ser significativamente más inmunogénicas que los agregados de OMPs, incrementándose la inmunogenicidad cuando se recurrió al uso de diferentes adyuvantes.<sup>41</sup>

Las dos vacunas basadas en proteínas de membrana externa más ampliamente estudiadas son las desarrolladas en la década de los 80 en respuesta a los brotes de la enfermedad que se produjeron en Cuba y Noruega. De los estudios realizados sobre ellas<sup>42,43</sup> se deduce que las vacunas de OMVs parecen presentar las proteínas de membrana externa en una conformación suficientemente natural como para permitir la generación de anticuerpos bactericidas funcionales al menos en adolescentes y adultos. La respuesta de anticuerpos generada también parece mostrar un incremento de la opsonofagocitosis del meningococo. Hay que tener en cuenta que la composición precisa de estas vacunas (contenido en OMP, LPS o presencia de adyuvante<sup>44</sup>) será de gran importancia en la inmunogenicidad de la misma, razón

---

<sup>40</sup> **Frasch CE, Peppler MS.** Protection against group B *Neisseria meningitidis* disease: Preparation of soluble protein and protein polysaccharide immunogens. *Infect Immun.* 1982; 37: 271–280.

<sup>41</sup> **deKleij ED, De Groof R, Lafeber AB, Labadie J, van Limpt KC et al.** Immunogenicity and safety of monovalent P1.7 (h) 4 meningococcal outer membrane vesicle vaccine in toddlers: comparison of two vaccination schedules and two vaccine formulations. *Vaccine.* 2000; 19: 1141–1148.

<sup>42</sup> **Sierra CV, Campa HC, Varcacel NM et al.** Vaccine against group B *Neisseria meningitidis*: protection trial and mass vaccination results in Cuba. *NIPH and Dis.* 1991; 14: 195–210.

<sup>43</sup> **Bjune G, Hoiby EA, Gronnesbay JK, Arnesen O, Fredriksen JH et al.** Effect of outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease. *Lancet.* 1991; 338: 1093–1096.

<sup>44</sup> **Gómez JA, Hernández E, Criado MT, Ferreirós CM.** Effect of adjuvants in the isotypes and bactericidal activity of antibodies against the transferrin-binding proteins of *Neisseria meningitidis*. *Vaccine.* 1998; 16: 1633–1639.

por la cual la producción y estandarización resultarán muy complejas, pudiendo llegar a darse variabilidad entre distintos lotes.

En general, el mayor problema de las vacunas de OMVs es que parecen ofrecer un limitado grado de inmunogenicidad contra cepas heterólogas a las utilizadas en su producción. Los niveles de reactividad cruzada varían mucho de cepa a cepa y además parecen ser dependientes de la edad. Ambas vacunas han sido utilizadas para el control epidémico en sus países de origen, en el caso de la vacuna cubana, en Brasil y Chile y en el de la noruega en el departamento de Seine-Maritime y en la zona de Dieppe<sup>45</sup> (Francia) siendo efectivas en un 50%-80% de los casos, si bien no son protectivas en niños menores de 4 años,<sup>46</sup> presentan una respuesta de corta duración y parecen no afectar al estado de portador. El análisis de los sueros postvacunales de los dos estudios sugiere que los anticuerpos contra la PorA y la OpcA (comúnmente llamada Opc) son los más importantes en la mediación de la actividad bactericida del suero, siendo la PorA la más inmunogénica de las proteínas, si bien en el estudio noruego se observó una clara evidencia de actividad bactericida originada por otras proteínas de membrana externa.

Hasta el momento actual, las vacunas basadas en OMVs han sido las más ampliamente utilizadas de entre todas las existentes contra el serogrupo B y aunque no son la solución definitiva para combatir la

---

<sup>45</sup> **Taha MK, Zarantonelli ML, Alonso JM, Naess LM, Holst J et al.** Use of available outer membrane vesicle vaccines to control serogroup B meningococcal outbreaks. *Vaccine*. 2007; 25: 2537–2538

<sup>46</sup> **Jodar L, Cartwright K, Feavers IM.** Standardisation and validation of serological assays for the evaluation of immune responses to *Neisseria meningitidis* serogroup A and C vaccines. *Biologicals*. 2000; 28: 193–197.



enfermedad, son útiles en el contexto de un brote epidémico generado por meningococos con un único tipo de PorA.

Aunque como ya hemos comentado, las proteínas de membrana pueden inducir una respuesta inmune funcional contra la enfermedad provocada por el serogrupo B, ninguna de ellas es capaz de generar una protección universal debido a la gran heterogeneidad de las regiones expuestas en la superficie de las mismas. La modesta inmunidad por reactividad cruzada inducida por las vacunas basadas en estas proteínas, ha conducido a la búsqueda de un antígeno o antígenos de membrana externa que generen anticuerpos funcionales y que estén presentes de forma generalizada en todas las cepas meningocócicas.<sup>47</sup> Si tal antígeno existiese, podría ser la base de una vacuna verdaderamente universal que eliminaría el posible problema del “switching capsular” en las cepas patógenas tras la vacunación con el polisacárido.

Ya que parece evidente que la variabilidad de la proteína inmunodominante PorA podría limitar su uso como vacuna universal, se están considerando otras proteínas mayoritarias de membrana, algunas de las cuales ya están en un avanzado estado de desarrollo. Entre estas proteínas se incluyen las proteínas de clase 5 (OpcA), la NspA y proteínas reguladas por hierro (TbpA y TbpB, FbpA y FetA). De todos estos antígenos, la TbpB ha sido la más exhaustivamente estudiada, observándose que la vacunación con esta proteína genera

---

<sup>47</sup> **Sánchez S, Troncoso G, Ferreirós CM, Criado MT.** Evaluation of cross-reactive antigens as determinants of cross-bactericidal activity in pathogenic and commensal *Neisseria*. *Vaccine*. 2001; 19: 3390–3398.

protección en ratón contra la septicemia meningococal,<sup>48</sup> aunque los primeros estudios clínicos en humanos demostraron que los niveles de anticuerpos bactericidas desarrollados tras la vacunación son muy bajos.<sup>49</sup> Trabajos posteriores han evidenciado la existencia de una considerable variabilidad en la TbpB entre cepas patógenas de *Neisseria meningitidis*,<sup>50,51</sup> por lo que parece que sería necesario incorporar un cierto número de variantes de TbpB si se pretende que una vacuna basada en el uso de esta proteína ofrezca una amplia protección. La TbpB forma parte, junto con la TbpA, del complejo de unión a transferrina portadora del hierro.<sup>52,53</sup> Trabajos recientes sugieren que la TbpA tiene un mayor papel funcional en la unión al hierro y es un inmunógeno más efectivo que la TbpB. De hecho, en ratones se observa que cuando son vacunados con un complejo TbpA/TbpB o con TbpA se obtiene protección contra la septicemia meningocócica causada por cepas homólogas y heterólogas, mientras

---

<sup>48</sup> **Danve B, Lissolo L, Mignon M, Dumas P, Colombani S et al.** Transferrin-binding proteins isolated from *Neisseria meningitidis* elicit protective and bactericidal antibodies in laboratory animals. *Vaccine*. 1993; 11:1214–1220.

<sup>49</sup> **Danve B, Lissolo L, Guinet F, Boutry E, Speck D et al.** Safety and immunogenicity of a *N. meningitidis* group B transferring-binding protein vaccine in adults. En: *Proceedings of the Eleventh International Pathogenic Neisseria Conference*. Nassif X, Quentin-Millet M-J, Taha M-K. (Eds). Pág. 53. 1998. EDK. Paris.

<sup>50</sup> **Rokbi B, Renauld-Mongenie G, Mignon M, Danve B, Poncet D et al.** Allelic diversity of the two transferrin-binding protein B gene isotypes among a collection of *Neisseria meningitidis* strains representative of serogroup B disease : Implication for the composition of a recombinant TbpB-based vaccine. *Infect Immun*. 2000; 68: 4938–4947.

<sup>51</sup> **Ferrón L, Ferreirós CM, Criado MT, Pintor M.** Immunogenicity and antigenic heterogeneity of a human transferrin-binding protein in *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun*. 1992; 60: 2887–2892.

<sup>52</sup> **Pintor M, Gómez JA, Ferrón L, Ferreirós CM, Criado MT.** Análisis of TbpA and TbpB functionality in defective mutants of *Neisseria meningitidis*. *J Med Microbiol*. 1998; 47: 757–760.

<sup>53</sup> **Ferreirós CM, Criado MT, Pintor M, Ferrón L.** Analysis of the molecular mass heterogeneity of the transferrin receptor in *Neisseria meningitidis* and commensal *Neisseria*. *FEMS Microbiol Lett*. 1991; 84: 247–254.

que si la vacunación se lleva a cabo con TbpB recombinante, la protección es menor.<sup>54</sup>

Mediante la aplicación de una nueva técnica en la que se utilizan combinaciones de proteínas de membrana de diversas cepas para inmunizar ratones, se ha descubierto una proteína minoritaria de membrana externa a la que se denominó NspA.<sup>55</sup> La inmunización de ratones con la NspA recombinante mostró que inducía una respuesta bactericida cruzada contra cepas de los serogrupos A y C, protegiéndolos asimismo contra la infección meningocócica letal.<sup>56</sup> La comparación de secuencias entre cepas meningococales genéticamente divergentes demostró que esta proteína está altamente conservada (97% de homología),<sup>57</sup> apareciendo en el 99,2% de las cepas probadas de los serogrupos A y C.<sup>58</sup> Aunque estos datos parecen sugerir que la NspA es un candidato prometedor para una vacuna, los resultados de Moe y Granoff muestran que el suero policlonal de ratón anti-NspA recombinante no se une a la superficie de cerca de un 35% de las cepas del serogrupo B estudiadas a pesar de la presencia del gen *nspA* en esos organismos,<sup>59</sup> lo que sugiere bien una expresión variable de la proteína o bien una ocultación de los epitopos NspA por el

<sup>54</sup> West D, Reddin K, Matheson M, Heath R, Funnell S *et al.* Recombinant meningitidis transferrin-binding protein A protects against experimental meningococcal infection. *Infect Immun.* 2001; 69: 1561–1567.

<sup>55</sup> Martín D, Cadieux N, Ámel J, Brodeur BR. Highly conserved *Neisseria meningitidis* surface protein confers protection against experimental infection. *J Exp Med.* 1997; 185: 1173–1183.

<sup>56</sup> Robinson A, Melling J. Envelope structure and the development of new vaccines. *J App Bact.* 1993; 74: 43S–51S.

<sup>57</sup> Cadieux N, Plante M, Rioux CR, Hamel J, Brodeur BR *et al.* Bactericidal and cross-protective activities of a monoclonal antibody directed against *N. meningitidis* group B strains. *Infect Immun.* 1999; 67: 4955–4959.

<sup>58</sup> Pollard AJ, Frasch C. Development of natural immunity to *Neisseria meningitidis*. *Vaccine.* 2001; 19: 1327–1346.

<sup>59</sup> Moe GR, Tan S, Granoff DM. Differences in surface expression of NspA among *N. meningitidis* group B strains. *Infect Immun.* 1999; 67: 5664–5675.

polisacárido capsular, lo cual lleva a pensar en la posibilidad de que los epitopos conservados lo estén precisamente porque no están sometidos a presión inmunológica al no ser accesibles por el sistema inmune, pudiendo darse el caso de que los antígenos sean inmunogénicos pero no sean útiles en estudios de protección.

Otro candidato clásico para la vacuna es el lipopolisacárido (LPS). En el suero de pacientes de enfermedad meningocócica se encontraron anticuerpos contra el mismo que en algunos casos resultaron ser bactericidas.<sup>60</sup> Plested y colaboradores obtuvieron en ratón un anticuerpo monoclonal que reconocía un epitopo conservado en el núcleo interno del LPS en más del 70% de una colección de meningococos de los serogrupos A y B.<sup>61</sup> Previamente se había llevado a cabo otro estudio que utilizaba una vacuna conjugada de LPS, observándose que ésta era inmunogénica y producía suero bactericida contra meningococos heterólogos.<sup>62</sup>

La capacidad de producir anticuerpos de protección cruzada contra un gran número de meningococos del serogrupo B observada en las vacunas de LPS ensayadas ha mantenido la vigencia del estudio de este antígeno, que sigue siendo considerado un elemento a introducir en las nuevas formulaciones vacunales.

---

<sup>60</sup> **Tramont EC, Sadoff JC, Artenstein MS.** Cross-reactivity of *Neisseria gonorrhoeae* and *N. meningitidis* and the nature of antigens involved in the bacterial reaction. *J Infect Dis.* 1974; 130: 240–247.

<sup>61</sup> **Plested JS, Makepeace K, Jennings MP, Gidney MA, Lacelle S et al.** Conservation and accessibility of an inner core lipopolysaccharide epitope of *N. meningitidis*. *Infect Immun.* 1999; 67: 5417–5426.

<sup>62</sup> **Arumugham R, Fortuna-Nevin M, Mountzouros K.** Development of lipopolysaccharide-protein conjugate vaccines against group B *N. meningitidis*. En: *Proceedings of the Fifth Conference of the International Endotoxin Society*. Pág. 52. 1998. Santa Fe. (USA).

## 2.2 Vacunas recombinantes

Debido a la variabilidad de la PorA, la protección ofrecida por una vacuna basada en OMVs procedente de una sola cepa podría estar limitada por el serosubtipo. En un intento de solventar este problema, en Holanda se desarrolló una vacuna de proteínas de membrana externa que contenía PorA de seis cepas patogénicas prevalentes<sup>63</sup> que ha sido capaz de inducir actividad bactericida contra cepas que presentan cada una de las seis PorA en recién nacidos,<sup>64</sup> niños de corta edad y escolares cuando se aplicó en un régimen de tres dosis, si bien su efectividad parece estar limitada por factores tales como la variabilidad antigénica de cada uno de los antígenos PorA, que puede impedir la generación de una buena respuesta contra todos los serotipos incluidos en la vacuna, la no generación de respuesta de reactividad cruzada contra las cepas de tipo salvaje que tengan PorA similares, pero no iguales, o el hecho de que el perfil antigénico de los aislados patógenos cambia rápidamente, de modo que una vacuna que ofrezca cobertura contra un número limitado de cepas seleccionadas es probable que en pocos años se convierta en inefectiva a menos que su composición sea modificada de acuerdo con la epidemiología local. Para conseguir una protección más amplia, se desarrolló una vacuna nonavalente (NonaMen) añadiendo un tercer tipo de OMV trivalente recombinante para así cubrir los 9 subtipos que aparecen con mayor frecuencia en los países desarrollados.<sup>65</sup>

---

<sup>63</sup> **Classen I, Meylis J, van der Ley P, Peeters C, Brons H et al.** Production, characterization and control of *Neisseria meningitidis* hexavalent class I outer membrane protein containing vesicle vaccine. *Vaccine*. 1996; 14: 1001–1008.

<sup>64</sup> **Cartwright K, Morris R, Rumke H, Fox A, Borrow R et al.** Immunogenicity and reactogenicity in UK infants of a novel meningococcal vesicle vaccine containing multiple class I (PorA) outer membrane proteins. *Vaccine*. 1999; 17: 2612–2619.

<sup>65</sup> **Van den Dobbelsteen G, van Dijken H, Hamstra HJ, Ummels R, Van Alphen L et al.** From HexaMen to NonaMen: expanding a multivalent PorA-based meningococcal outer membrane

Recientemente se han publicado buenos resultados de inmunogenicidad en ratones con una vacuna experimental que combina 13 serotipos de *Streptococcus pneumoniae* conjugados con la toxina diftérica atóxica CRM-197 de WYeth Ltd., junto con 9 PorA del meningococo B (NonaMen) del Netherlands Vaccine Institute.<sup>66</sup>

En Nueva Zelanda también se ha utilizado la tecnología recombinante en un esfuerzo para luchar contra la cepa NZ98/254, produciéndose tanto una vacuna monovalente contra la PorA de la cepa prevalente como una vacuna hexavalente que incluye 6 porA, entre ellas la de la cepa NZ98/254. La efectividad del antígeno PorA NZ98/254 en la formulación hexavalente administrada en un régimen de tres dosis resultó ser satisfactoria en bebés y niños de corta edad.<sup>67</sup>

### 2.3 Antígenos derivados del genoma: vacunología reversa.

Las vacunas convencionales requieren además de que el patógeno pueda cultivarse en el laboratorio, la identificación de sus componentes y su producción de una forma pura, bien directamente a partir de la bacteria o bien mediante tecnología de DNA recombinante para que pueda ser probada su capacidad de inducir inmunidad. Todo el proceso requiere un gran consumo de tiempo y sólo permite la identificación de aquellos antígenos que pueden ser purificados en cantidades

---

vesicle vaccine. En: *Proceedings of the 14th International Pathogenic Neisseria Conference*. Apicella MA and Seifert HS (Eds.) Pág. 153. 2004. Milwaukee, WI.

<sup>66</sup> **van den Dobbelsteen GP, van Dijken HH, Pillai S, van Alphen L.** Immunogenicity of a combination vaccine containing pneumococcal conjugates and meningococcal PorA OMVs. *Vaccine*. 2007; 25: 2491–2496.

<sup>67</sup> **Longworth E, Borrow R, Goldblatt D, Balmer P, Dawson M, et al.** Avidity maturation following vaccination with a meningococcal recombinant hexavalent PorA OMV vaccine in UK infants. *Vaccine*. 2002; 20: 2592–2596.

adecuadas. Como las proteínas más abundantes no son en muchos casos los candidatos más adecuados para el desarrollo de una vacuna y a que las herramientas genéticas requeridas para identificar los componentes abundantes pueden ser inadecuadas, el desarrollo de una de estas vacunas puede llevar décadas.

Como resultado de la utilización de la tecnología genética a finales del siglo XX se ha producido una gran revolución en el desarrollo de vacunas. Tecnologías como la secuenciación génica, la proteómica, la espectrofotometría de masas, los microarrays de DNA o la tecnología de expresión *in vivo* (IVET) entre otras han revolucionado el modo de estudiar la patogénesis bacteriana y el diseño de vacunas. La posibilidad de determinar la secuencia genómica completa de una bacteria en pocos meses y con un coste reducido ha permitido la secuenciación del genoma de muchas bacterias patógenas en un corto período de tiempo, de modo que las bases de datos contienen hoy en día las secuencias completas de más de 600 bacterias, incluyendo muchos patógenos bacterianos.<sup>68</sup> Con estos datos, cada antígeno puede ser estudiado en cuanto a su capacidad de inducir una respuesta inmune protectora.

En el caso concreto de *N. meningitidis* serogrupo B, el genoma completo de la cepa MC58<sup>69</sup> ha sido obtenido mediante la estrategia de “random shotgun”. La secuencia fue analizada con el fin de buscar y seleccionar ORF (open reading frames) que codificasen para proteínas secretadas o expuestas en la superficie. Estos posibles antígenos

---

<sup>68</sup> <http://www.genomesonline.org>

<sup>69</sup> Tettelin H, Saunders NJ, Heidelberg J, Jeffries AC, Nelson KE *et al.* Complete genome sequence of *N. meningitidis* serogroup B strain MC58. *Science*. 2000; 287: 1809–1815.

incluían diferentes tipos de proteínas de acuerdo con su posible localización en la superficie bacteriana: proteínas de membrana externa o secretadas, lipoproteínas, proteínas de membrana interna, proteínas periplasmáticas y proteínas que presentan homología con factores involucrados en la virulencia y patogénesis.<sup>70</sup> Las ORFs fueron amplificadas por PCR y clonadas en *E.coli* con el fin de expresar cada gen como una proteína de fusión. Las proteínas expresadas con éxito fueron purificadas y utilizadas para la inmunización de ratones, observándose que algunas estaban expuestas en la superficie celular y eran capaces de inducir anticuerpos con actividad bactericida.

Mientras que la mayoría de los antígenos identificados de modo convencional mostraban variabilidad entre cepas o eran expresados únicamente por algunas de ellas, resultando en la generación de una respuesta inmune dirigida sólo contra las cepas homólogas, no contra las heterólogas, el estudio de los antígenos candidatos seleccionados mediante análisis genómico reveló que la mayor parte de ellos estaban bien conservados, siendo pocos los que presentaban regiones altamente variables. La mayoría de estos antígenos, al ser evaluados en ensayos bactericidas, generaron protección cruzada contra cepas heterólogas. Sorprendentemente, los antígenos detectados mediante métodos genéticos resultaron ser diferentes de los identificados por vacunología tradicional, pues además de las clásicas proteínas de membrana externa con bucles variables aparecían lipoproteínas y proteínas de forma globular expuestas en la superficie que carecen de dominios

---

<sup>70</sup> **Pizza M, Scarlato V, Masignani V, Giuliani MM, Arico B et al.** Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. *Science*. 2000; 287: 1816–1820.



transmembrana. Algunos de estos antígenos no se encuentran de forma abundante en la superficie bacteriana.

En solo unos años de vacunología reversa se han identificado más candidatos para el desarrollo de una vacuna que en los 40 años previos, de modo que quince de estos nuevos antígenos están ya en una avanzada etapa de investigación, aunque todavía es muy pronto para aventurar cuándo estará disponible una vacuna contra todos los serogrupos del meningococo.

#### 2.4 Vacunas basadas en OMVs de *Neisseria lactamica*.

Tradicionalmente se ha asociado la protección contra la enfermedad meningocócica invasiva con la presencia en el suero de anticuerpos bactericidas contra *N. meningitidis*, que son adquiridos de modo progresivo a lo largo de los primeros años de vida.<sup>9</sup> Sin embargo, durante este período, el estado de portador de *N. meningitidis* es raro, por lo que se ha postulado que la adquisición de la inmunidad natural se debe a la colonización de la nasofaringe por especies comensales del género *Neisseria* y otras bacterias que presentan reactividad cruzada con los meningococos.

La evidencia epidemiológica sugiere que *N. lactamica* podría ser la más importante de las bacterias no patógenas que contribuyen a la adquisición de la inmunidad natural frente a *N. meningitidis*. Las bacterias de esta especie tienen una significativa reactividad cruzada con *N. meningitidis*,<sup>71</sup> pero carecen de su potencial patógeno debido muy probablemente a su incapacidad para sobrevivir en el torrente

---

<sup>71</sup> **Troncoso G, Sánchez S, Moreda M, Criado MT, Ferreirós CM.** Antigenic cross-reactivity between outer membrane proteins of *N. meningitidis* and commensal *Neisseria* species. *FEMS Immunol. Med Microbiol.* 2000; 27: 103–109.

circulatorio a causa de la ausencia de cápsula. La posibilidad de que el estado de portador de *N. lactamica* tenga un efecto inhibitor sobre la enfermedad meningocócica ha sido estudiada desde la caracterización organismo en 1969. Se observa que este estado tiene un pico (20%) en el intervalo de edad comprendido entre 0 y 4 años, precediendo a la incidencia reducida de la enfermedad en niños mayores. Gold y colaboradores<sup>72</sup> demostraron que el 66% de los portadores de *N. lactamica* estudiados desarrollaban anticuerpos bactericidas contra meningococos de los serogrupos A, B y C, siendo estos anticuerpos los responsables de la inmunidad contra la enfermedad meningocócica dependiente de la edad.

Se ha observado que una proporción sustancial de los anticuerpos presentes en el suero de pacientes con enfermedad meningocócica pueden ser adsorbidos con proteínas de membrana externa de *N. lactamica*<sup>73</sup> y que antígenos de *N. lactamica* protegen a ratones contra la infección experimental.<sup>74,75,76</sup> Esta especie es pues un buen candidato para el desarrollo de una vacuna, pues al imitar el modelo de infección que tiene lugar durante la infancia reforzaría la inmunidad natural, además de ser independiente de serogrupo y serosubtipo.

---

<sup>72</sup> Gold R, Goldschneider I, Lepow ML, Draper TF, Randolph M. Carriage of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* in infants and children. *J Infect Dis.* 1978; 137: 112–121.

<sup>73</sup> Maclan J, Wedege E. Serum antibodies to cross-reactive *Neisseria* outer membrane antigens in healthy persons and patients with meningococcal disease. *AMPS.* 1989; 97: 774–780.

<sup>74</sup> Oliver KJ, Reddin KM, Bracegirdle P, Hudson MJ, Borrow R, et al. *Neisseria lactamica* protects against experimental meningococcal infection. *Infect Immun.* 2002; 70: 3621–3626.

<sup>75</sup> Bracegirdle P, Oliver K, Reddin K, Cartwright K, Feavers I et al. *N. lactamica* provides a cross-reactive vaccine against meningococcal disease. En: *Proceedings of the 12<sup>th</sup> International Pathogenic Neisseria Conference.* Rice P. Sparling F. Shafer W. (Eds.) Pág. 46. 2000. HCC Inc. Galveston.

<sup>76</sup> Li Y, Zhang Q, Winterbotham M, Mowe E, Gorringe A, Tang CM. Immunization with live *Neisseria lactamica* protects mice against meningococcal challenge and can elicit serum bactericidal antibodies. *Infect Immun.* 2006; 74: 6348–6355.

Actualmente existe una vacuna basada en OMVs de *N. lactamica* cuya inmunogenicidad y seguridad están siendo sometidas a un estudio en fase I en voluntarios adultos.<sup>77</sup> La administración de este tipo de vacunas debería plantearse teniendo en cuenta las posibles consecuencias en el desarrollo de la inmunidad natural.

### **3 Proteínas de membrana externa y su papel en la patogenicidad del meningococo**

*Neisseria meningitidis* pertenece al grupo de las bacterias Gram-negativas, caracterizadas por tener una membrana externa que rodea su capa de peptidoglicano y les proporciona una cubierta semipermeable que protege la célula bacteriana. La membrana externa constituye, por tanto, la interfase entre el exterior e interior de la célula y como tal, contiene numerosos tipos de proteínas críticos para la actividad biológica, como son las de transporte o las formadoras de canales. Además, la superficie del meningococo es la parte con la que éste contacta más íntimamente con el huésped, de manera que las proteínas de membrana van a ser importantes en los procesos de colonización, invasión y patogénesis. Estas proteínas también son relevantes desde el punto de vista médico, pues pueden ser reconocidas en el microorganismo intacto y servir como blancos para la respuesta inmune protectora.

Estructuralmente, las proteínas de membrana externa pueden ser de dos tipos: *lipoproteínas*, que están ancladas a la membrana externa por su zona lipídica N-terminal o *proteínas integrales*, que contienen regiones transmembrana.

---

<sup>77</sup> Gorringe A, Halliwell D, Matheson M, Reddin K, Finney M, Hudson M. The development of a meningococcal disease vaccine based on *Neisseria lactamica* outer membrane vesicles. *Vaccine*. 2005; 23: 2210–2203.

### 3.1 Proteínas de autotransporte

El análisis del secretoma predicho de *N. meningitidis* revela que los **autotransportadores** son la clase más importante de proteínas secretadas en esta bacteria.<sup>78</sup> Son proteínas modulares consistentes en una secuencia señal N-terminal, un dominio secretado pasajero y un dominio translocador C-terminal.<sup>79,80</sup> La secuencia señal dirige a la proteína hacia la maquinaria SEC para su transporte a través de la membrana interna<sup>81</sup> y el segmento translocador C-terminal media el paso del dominio pasajero formando una  $\beta$ -lámina a través de la membrana externa en un proceso que requiere la intervención de la proteína Omp85.<sup>82</sup> Al alcanzar la superficie celular, los pasajeros se liberan de forma autocatalítica y son secretados al medio, donde suelen llevar a cabo funciones relacionadas con la patogénesis.<sup>83</sup> Hasta el momento se han estudiado 7 autotransportadores:<sup>84</sup>

- La **IgA1 proteasa** es una serina proteasa codificada por el gen *iga*. Esta proteína rompe específicamente la inmunoglobulina A1 humana, lo que sugiere la existencia de una vía funcional en la que

---

<sup>78</sup> van Ulsen P, Adler B, Fassler P, Gilbert M, van Schilfgaarde M, et al. A novel phase-variable autotransporter serine protease, AusI, of *Neisseria meningitidis*. *Microbes Infect.* 2006; 8: 2088–2097.

<sup>79</sup> Pohlner J, Halter R, Beyreuther K, Meyer TF. Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease, *Nature* 1987; 325: 458–462.

<sup>80</sup> Henderson IR, Navarro-Garcia F, Desvaux M, Fernandez RC, Ala'Aldeen D. Type V secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004; 68: 692–744.

<sup>81</sup> Sijbrandi R, Urbanus ML, ten Hagen-Jongman CM, Bernstein HD, Oudega B et al. Signal recognition particle (SRP)-mediated targeting and Sec-dependent translocation of an extracellular *Escherichia coli* protein. *J Biol Chem.* 2003; 278: 4654–4659.

<sup>82</sup> Voulhoux R, Bos MP, Geurtsen J, Mols M, Tommassen J Role of a highly conserved bacterial protein in outer membrane protein assembly. *Science.* 2003; 299: 262–265.

<sup>83</sup> Henderson IR, Nataro JP. Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect Immun.* 2001; 69: 1231–1243.

<sup>84</sup> van Ulsen P, Tommassen J. Protein secretion and secreted proteins in pathogenic *Neisseriaceae*. *FEMS Microbiol Rev.* 2006; 30: 292–319.

las IgA1 proteasas protegen a la bacteria del sistema inmune.<sup>85,86</sup> Además es capaz de romper otras proteínas<sup>87,88,89</sup> y de provocar la producción de citoquinas como TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL6, lo que indica que su papel en la patogénesis y mantenimiento del estado de portador puede ser importante.

- *autA* y *autB* codifican homólogos de la adhesina AIDA-1 de *E. coli*.
- App es una proteína transportadora de tipo serina proteasa<sup>90</sup> altamente conservada en las cepas patógenas. Existen evidencias de su comportamiento como adhesina e implicación en la interacción inicial entre el meningococo y las células epiteliales.<sup>91</sup>
- NhhA también es una presunta adhesina altamente conservada que forma oligómeros en la membrana externa.<sup>92</sup>
- La proteasa NalP tiene su función en el procesamiento de la IgA proteasa y de App, las principales proteínas de secreción de *Neisseria meningitidis*.

<sup>85</sup> Weiser, JN, Bae D, Fasching C, Scamurra RW, Ratner AJ *et al*. Antibody-enhanced pneumococcal adherence requires IgA1 protease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100: 4215–4220.

<sup>86</sup> Kilian M, Reinholdt J, Lomholt H, Poulsen K, Frandsen EV. Biological significance of IgA1 proteases in bacterial colonization and pathogenesis: critical evaluation of experimental evidence. *APMIS*. 1996; 104: 321–338.

<sup>87</sup> Hauck CR, Meyer TF. The lysosomal/phagosomal membrane protein h-lamp -1 is a target of the IgA1 protease of *Neisseria gonorrhoeae*. *FEBS Lett*. 1997; 405: 86–90.

<sup>88</sup> Lin L, Ayala P, Larson J, Mulks M, Fukuda M *et al*. The *Neisseria* type 2 IgA1 protease cleaves LAMP1 and promotes survival of bacteria within epithelial cells. *Mol Microbiol*. 1997; 24: 1083–1094.

<sup>89</sup> Senior BW, Stewart WW, Galloway C, Kerr MA. Cleavage of the hormone human chorionic gonadotropin, by the Type 1 IgA1 protease of *Neisseria gonorrhoeae*, and its implications. *J Infect Dis*. 2001; 184: 922–925.

<sup>90</sup> Hadi HA, Wooldridge KG, Robinson KR, Ala'Aldeen DAA. Identification and characterization of App: an immunogenic autotransporter protein of *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol*. 2001; 41: 611–623.

<sup>91</sup> Serruto D, Adu-Bobie J, Scarselli M, Veggi D, Pizza M *et al*. *Neisseria meningitidis* App, a new adhesin with autocatalytic serine protease activity. *Mol Microbiol*. 2003; 48: 323–334.

<sup>92</sup> Peak IRA, Srikhanta Y, Dieckelmann M, Moxon ER, Jennings MP. Identification and characterisation of a novel conserved outer membrane protein from *Neisseria meningitidis*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2000; 28: 329–334.

- AusI (autotransporter serine protease I) es específica de *N. meningitidis*, pero no está presente en todas las cepas de la especie. Su secuencia es similar a la de App e IgA proteasa de *N. meningitidis*, lo que podría indicar una funcionalidad parecida. Se sabe que su expresión está sujeta a variación de fase, pero su función todavía no han sido determinada.

### 3.2 Proteínas implicadas en la captación de metabolitos

El hierro es un nutriente de vital importancia para el meningococo<sup>93</sup> cuya carencia provoca la disminución de las tasas de replicación y respiración del microorganismo, razón por la que la capacidad de adquisición de hierro se considera un determinante fundamental de patogénesis en *N. meningitidis*.<sup>94</sup> Esta bacteria posee una gran cantidad de proteínas receptoras y de sistemas de captación de hierro<sup>95</sup> que ejercen su función cuando se encuentra en los distintos ambientes que va a ocupar dentro del huésped, ya sea la superficie de la mucosa, la sangre o el fluido cerebroespinal. Los sistemas de captación de hierro de *N. meningitidis* TbpA/TbpB, LbpA/LbpB, HpuA/HpuB y HmbR le permiten utilizar los sideróforos humanos transferrina, lactoferrina y hemoglobina. Además la especie presenta un receptor para el sideróforo exógeno enterobactina (FetA).<sup>96</sup> Todos

---

<sup>93</sup> Archibald FS, DeVoe IW. Iron in *Neisseria meningitidis*: minimum requirements, effects of limitation, and characteristics of uptake. *J Bacteriol.* 1978; 136: 35–48.

<sup>94</sup> van Putten JP. Iron acquisition and the pathogenesis of meningococcal and gonococcal disease. *Med Microbiol Immunol.* 1990; 179: 289–295.

<sup>95</sup> Perkins-Balding D, Ratliff-Griffin M, Stojiljkovic I. Iron transport systems in *Neisseria meningitidis*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004; 68: 154–171.

<sup>96</sup> Gorringer AR, Oakhill J. *Neisseria meningitidis*: multiple mechanisms to acquire iron. En: *Emerging strategies in the fight against meningitis: molecular and cellular aspects*. Ferreirós CM and Vázquez J (Eds.) Págs. 119–134. 2002. Horizon Scientific Press. Wymondham, Reino Unido.

ellos son proteínas de membrana externa que en el caso de TbpA, LbpA, HmbR, HpuB y FetA tienen homología con las proteínas dependientes de TonB.<sup>97,98,99,100</sup> Se cree que TbpB, LbpB y HpuA están asociadas periféricamente a la membrana externa<sup>101</sup> y facilitan la unión inicial del sideróforo, mientras que TbpA, LbpA y FetA permiten el paso de hierro al periplasma, de donde es transportado al citoplasma mediante el sistema FbpABC.<sup>102</sup> Los receptores de hemoglobina (Hb) permiten el paso de hemo al periplasma, desde donde es transportado a través de la membrana interna por una ATPasa y una permeasa. La expresión de la mayor parte de las proteínas de captación de hierro es regulada por *fur*, que tiene al hierro como corepresor.

---

<sup>97</sup>**Buchanan SK, Smith BS, Venkatramani L, Xia D, Esser L et al.** Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from *Escherichia coli*. *Nat Struct Biol.* 1999; 6: 56–63.

<sup>98</sup>**Boulton IC, Yost MK, Anderson JE, Cornelissen CN.** Identification of discrete domains within gonococcal transferrin-binding protein A that are necessary for ligand binding and iron uptake functions. *Infect Immun.* 2000; 68: 6988–6996.

<sup>99</sup>**Perkins-Balding D, Baer MT, Stojiljkovic I.** Identification of functionally important regions of a haemoglobin receptor from *Neisseria meningitidis*. *Microbiology.* 2003; 149: 3423–3435.

<sup>100</sup>**Pettersson A, Kortekaas J, Weynants VE, Voet P, Poolman JT et al.** Vaccine potential of the *Neisseria meningitidis* lactoferrin-binding proteins LbpA and LbpB. *Vaccine.* 2006; 24: 3545–3557.

<sup>101</sup>**Lissolo L, Dumas P, Maitre G, Quentin-Millet MJ.** Preliminary biochemical characterization of transferrin binding proteins from *Neisseria meningitidis*. En: *Pathobiology and Immunobiology of Neisseriaceae*. Conde-Glez CJ Morse S Rice P Sparling F and Calderon E. (Eds). Págs. 399–405. 1994. Publications Office INSP. Mexico.

<sup>102</sup>**Adhikari P, Berish SA, Nowalk AJ, Veraldi KL, Morse SA et al.** The fbpABC locus of *Neisseria gonorrhoeae* functions in the periplasm-to-cytosol transport of iron. *J Bacteriol.* 1996; 178: 2145–2149.

### 3.3 Porinas

Las porinas de *N. meningitidis* constituyen la clase de proteínas de membrana más abundantes en este microorganismo.<sup>103</sup> Su variedad antigénica es la base del sistema de serotipado.<sup>1</sup> Pertenecen a la superfamilia de porinas de Gram-negativas,<sup>104</sup> cuya estructura nativa es trimérica. Cada uno de los tres polipéptidos contiene una alta proporción de láminas  $\beta$ , lo que confiere al trímero una estructura (predicha) en  $\beta$ -barril,<sup>105</sup> formado por 16 láminas  $\beta$  anfipáticas que atraviesan la membrana y forman 8 bucles hidrofílicos expuestos en superficie.<sup>106</sup> Las regiones que forman el barril son las más conservadas, tanto entre especies como entre las distintas cepas de *N. meningitidis*, mientras que los bucles están formados por aquellas zonas con mayor variación tanto inter- como intraespecífica. Espacialmente, las 16 láminas  $\beta$  se pliegan formando un poro bien definido<sup>107</sup> en cuyo interior se sitúan las cadenas laterales hidrofílicas e hidrofóbicas de tamaño adecuado para permitir el paso de los solutos de bajo peso molecular.

Las porinas funcionan como poros y son esenciales para la supervivencia de la bacteria, pues modulan el intercambio de iones entre la célula y el medio. Pueden interactuar con membranas

---

<sup>103</sup> **Blake MS, Gotschlich EC.** Functional and immunological properties of pathogenic neisserial surface proteins. En: *Bacterial Outer Membranes as Model Systems*. Inouye M (Ed.) Págs. 377–400. 1986. John Wiley. New York.

<sup>104</sup> **Jeanteur D, Lakey JH, Pattus F.** The bacterial porin superfamily: sequence alignment and structure prediction. *Mol Microbiol.* 1991; 5: 2153–2164.

<sup>105</sup> **Minetti CA, Blake MS, Remeta DP.** Structural and functional characterization of a recombinant PorB class 2 protein from *Neisseria meningitidis*. Conformational stability and porin activity. *J Biol Chem.* 1997; 272: 10710–10720.

<sup>106</sup> **van der Ley P, Heckels JE, Virji M, Hoogerhout P, Poolman JT.** Topology of outer membrane porins in pathogenic *Neisseria* spp. *Infect Immun.* 1991; 59: 2963–2971.

<sup>107</sup> **Derrick JP, Urwin R, Suker J, Feavers IM, Maiden MC.** Structural and evolutionary inference from molecular variation in *Neisseria* porins. *Infect Immun.* 1999; 67: 2406–2413.



artificiales, membranas lipídicas planares<sup>108</sup> y células eucariotas<sup>109,110</sup> formando canales acuosos transmembrana<sup>111</sup> que permiten el transporte de moléculas a través de las bicapas lipídicas, proceso que lleva a la formación de un canal funcional a bajo potencial de membrana.<sup>112,113</sup> Cuando estos poros aparecen en las células de mamíferos, el tamaño y selectividad iónica de las moléculas que pasan a través de ellos está regulado por ATP y GTP, de manera que se produce un cambio transitorio en el potencial de membrana e interferencia con los procesos de señalización de la célula del huésped.<sup>114,115</sup> La PorB de *N. meningitidis* está involucrada en la regulación del potencial de membrana de las mitocondrias de la célula infectada, protegiéndolas de la apoptosis.<sup>116</sup> Otra propiedad importante

<sup>108</sup> **Young JD, Blake M, Mauro A, Cohn ZA.** Properties of the major outer membrane protein from *Neisseria gonorrhoeae* incorporated into model lipid membranes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1983; 80: 3831–3835.

<sup>109</sup> **van Putten JP, Duensing TD, Carlson J.** Gonococcal invasion of epithelial cells driven by P.IA, a bacterial ion channel with GTP binding properties. *J Exp Med*. 1998; 188: 941–952.

<sup>110</sup> **Weel JF, van Putten JP,** Fate of the major outer membrane protein P.IA in early and late events of gonococcal infection of epithelial cells. *Res Microbiol*. 1991; 142: 985–993.

<sup>111</sup> **Haines KA, Yeh L, Blake MS, Cristello P, Korchak H et al.** Protein I, a translocatable ion channel from *Neisseria gonorrhoeae*, selectively inhibits exocytosis from human neutrophils without inhibiting O<sub>2</sub> generation. *J Biol Chem*. 1988; 263: 945–951.

<sup>112</sup> **Mauro A, Blake M, Labarca P.** Voltage gating of conductance in lipid bilayers induced by porin from outer membrane of *Neisseria gonorrhoeae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988; 85: 1071–1075.

<sup>113</sup> **Song J, Minetti CA, Blake MS, Colombini M.** Successful recovery of the normal electrophysiological properties of PorB (Class 3) porin from *Neisseria meningitidis* after expression in *Escherichia coli* and renaturation. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1370: 289–298.

<sup>114</sup> **Rudel T, Schmid A, Benz R, Kolb HA, Lang F et al.** Modulation of *Neisseria* porin (PorB) by cytosolic ATP/GTP of target cells: parallels between pathogen accommodation and mitochondrial endosymbiosis. *Cell*. 1996; 85: 391–302.

<sup>115</sup> **Ulmer JB, Burke CJ, Shi C, Friedman A, Donnelly JJ et al.** Pore formation and mitogenicity in blood cells by the class 2 protein of *Neisseria meningitidis*. *J Biol Chem*. 1992; 267: 19266–19271.

<sup>116</sup> **Massari P, Ho Y, Wetzler LM.** *Neisseria meningitidis* porin PorB interacts with mitochondria and protects cells from apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97: 9070–9075.

de las porinas es su capacidad para aumentar la respuesta inmune hacia antígenos poco inmunogénicos.<sup>117,118</sup>

Los principales tipos de porinas presentes en *N. meningitidis* son:

- **Clase 1 o PorA**, es una porina catiónica de 44-47 kDa. Forma un complejo trimérico y aparece sola o asociada como homo o heterotrímico a la PorB<sup>119</sup> y es estabilizada por los diferentes componentes presentes *in vivo* como la proteína RmpM, el lipooligosacárido y/o los cationes divalentes.<sup>120</sup> No sufre variación de fase, pero su secuencia aminoacídica varía entre cepas en dos regiones variables (VR 1 y VR 2) localizadas en el ápice de los bucles de mayor longitud (I y IV).<sup>121</sup> Esta variabilidad que ha sido explotada para el desarrollo de la clasificación en serosubtipos del meningococo<sup>1</sup>.
- Las proteínas de **clase 2 y 3** son alelos del gen **PorB**, de 37-42 kDa. Su secuencia es similar a la de Ompf y PhoE de *E. coli*. Son trímeros dedicados al transporte aniónico. En el caso de esta porina, las regiones que muestran un alto nivel de variabilidad son 4, VR1 a 4, y se localizan respectivamente en los bucles I, V, VI, y

---

<sup>117</sup> **L.M. Wetzler.** Immunopotentiating ability of neisserial major outer membrane proteins. Use as an adjuvant for poorly immunogenic substances and potential use in vaccines. *Ann NY Acad Sci.* 1994; 730: 367–370.

<sup>118</sup> **Fusco PC, Michon F, Laude-Sharp M, Minetti CA, Huang CH et al.** Preclinical studies on a recombinant group B meningococcal porin as a carrier for a novel *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine. *Vaccine.* 1998; 16: 1842–1849.

<sup>119</sup> **Minetti CA, Blake MS, Remeta DP.** Characterization of the structure, function, and conformational stability of PorB class 3 protein from *Neisseria meningitidis*. A porin with unusual physicochemical properties. *J Biol Chem.* 1998; 273: 25329–25338.

<sup>120</sup> **Jansen C, Wiese A, Reubsæet L, Dekker N, de Cock HNK et al.** Biochemical and biophysical characterization of in vitro folded outer membrane porin PorA of *Neisseria meningitidis*. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1464: 284–298.

<sup>121</sup> **McGuinness BT, Lambden PR, Heckels JE.** Class 1 outer membrane protein of *Neisseria meningitidis*: epitope analysis of the antigenic diversity between strains, implications for subtype definition and molecular epidemiology. *Mol Microbiol.* 1993; 7: 505–514.

VII de la proteína.<sup>122,123</sup> La variabilidad de la PorB se utiliza para el serotipado del meningococo.

Se ha comprobado que algunas de las funciones de la PorB, como la capacidad para activar a las células B o la capacidad inserción en la membrana celular sólo aparecen cuando la proteína forma trímeros,<sup>124</sup> pero el canal existe en todos de los casos.

### 3.4 Proteínas de adherencia e invasión

La clase 5 incluye a las proteínas Opa y Opc.<sup>125</sup> La similitud entre ellas es del 22% y comparten una serie de características como su bajo pI, el formar trímeros, la hipervariabilidad en su expresión, el ser modificadas por temperatura o su expresión en superficie.<sup>126</sup>

- Las **Opa** (proteínas asociadas a la opacidad de la colonia) son adhesinas con un papel fundamental en la interacción con el endotelio y epitelio de la mucosa, por lo que están implicadas en la virulencia.<sup>127</sup> También ejercen su función como inmunomoduladores mediante interacción con macrófagos,

<sup>122</sup> **Bash M C, Lesiak K B, Banks S D, Frasch C E.** Analysis of *Neisseria meningitidis* class 3 outer membrane protein gene variable regions and type identification using genetic techniques. *Infect Immun.* 1995; 63:1484–1490.

<sup>123</sup> **Feavers IM, Suker J, McKenna AJ, Heath AB, Maiden MCJ.** Molecular analysis of the serotyping antigens of *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun.* 1992; 60: 3620–3629.

<sup>124</sup> **Massari P, King CA, MacLeod H, Wetzler LM.** Improved purification of native meningococcal porin PorB and studies on its structure/function. *Protein Expr Purif.* 2005; 44: 136–146.

<sup>125</sup> **Tsai CM, Frasch CE, Mocca L.** Five structural classes of major outer membrane proteins in *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol.* 1981; 146: 69–78.

<sup>126</sup> **Rosenqvist E, Hoiby EA, Wedege E, Kusecek B, Achtman M.** The 5C protein of *Neisseria meningitidis* is highly immunogenic in humans and induces bactericidal antibodies. *J Infect Dis.* 1993; 167: 1065–1073.

<sup>127</sup> **Hauck CR, Meyer TF.** ‘Small’ talk: Opa proteins as mediators of *Neisseria*-host-cell communication. *Curr Opin Microbiol.* 2003; 6: 43–49.

neutrófilos<sup>128</sup> y CD4+.<sup>129</sup> Estas proteínas constituyen una clase capaz de mostrar distinto tropismo y reacciones específicas con diferentes tipos de células del huésped<sup>130,131</sup> por su alta diversidad debida a variación antigénica y de fase,<sup>132,133</sup> recombinación entre loci dentro del propio genoma y por transformación genética horizontal.<sup>134,135</sup>

- Las **Opc** presentan homología débil con las Opa. El gen *opc* aparece en muchas cepas de meningococos, pero no en todas ellas y está asociado a la virulencia de las mismas. Este gen sufre variación clonal por mutación que provoca cambios en el nivel de expresión. Su expresión en meningococos no encapsulados le confiere a la bacteria la capacidad de adherirse e invadir células endoteliales independientemente de Opa y pili.<sup>136</sup> La Opc puede

---

<sup>128</sup> **Belland RJ, Chen T, Swanson T, Fischer SH.** Human neutrophil response to recombinant neisserial Opa proteins. *Mol Microbiol.* 1992; 6: 1729–1737.

<sup>129</sup> **Boulton IC, Gray-Owen SD.** Neisserial binding to CEACAM1 arrests the activation and proliferation of CD4+ T lymphocytes. *Nat Immunol.* 2002; 3: 229–236.

<sup>130</sup> **Moore J, Bailey SE, Benmechene Z, Tzitzilonis C, Griffiths NJ et al.** Recognition of saccharides by the OpcA, OpaD, and OpaB outer membrane proteins from *Neisseria meningitidis*. *J Biol Chem.* 2005; 280: 31489–31497.

<sup>131</sup> **Muenzner P, Dehio C, Fujiwara T, Achtman M, Meyer TF et al.** Carcinoembryonic antigen family receptor specificity of *Neisseria meningitidis* Opa variants influences adherence to and invasion of proinflammatory cytokine-activated endothelial cells. *Infect Immun.* 2000; 68: 3601–3607.

<sup>132</sup> **Kawula TH, Aho EL, Barritt DS, Klapper DG, Cannon JG.** Reversible phase variation of expression of *Neisseria meningitidis* class 5 outer membrane proteins and their relationship to gonococcal proteins II. *Infect Immun.* 1988; 56: 380–386.

<sup>133</sup> **Stern A, Meyer TF.** Common mechanism controlling phase and antigenic variation in pathogenic neisseriae. *Mol Microbiol.* 1987; 1: 5–12.

<sup>134</sup> **Hobbs MM, Seiler A, Achtman M, Cannon JG.** Microevolution within a clonal population of pathogenic bacteria: recombination, gene duplication and horizontal genetic exchange in the *opa* gene family of *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol.* 1994; 12: 171–180.

<sup>135</sup> **Hobbs MM, Malorny B, Prasad P, Morelli G, Kusecek B et al.** Recombinational reassortment among *opa* genes from ET-37 complex *Neisseria meningitidis* isolates of diverse geographical origins. *Microbiology.* 1998; 144:157–166.

<sup>136</sup> **Virji M, Makepeace K, Ferguson DJ, Achtman M, Moxon ER.** Meningococcal Opa and Opc proteins: their role in colonization and invasion of human epithelial and endothelial cells. *Mol Microbiol.* 1993; 10: 499–510.

unir indirectamente vitronectina para formar un puente molecular entre la bacteria y el receptor de la integrina en la superficie celular.

### 3.5 Otras proteínas

- La proteína de Clase 4, también llamada proteína modificable por reducción, **RmpM**,<sup>137</sup> cuyo Pm es de 32-34 kDa. Normalmente se encuentra asociada a otras proteínas, funcionando como estabilizador de los complejos receptores de lactoferrina (LbpA), transferrina (TbpA) y sideróforos<sup>138</sup> (FrpB), así como de los trímeros que forman *in vivo* PorA y PorB,<sup>120</sup> en los que la unión de esta proteína es esencial para la fijación del complejo a la membrana.

Estructuralmente, la RmpM es homóloga a la OmpA de *E. coli*, aunque carece del dominio  $\beta$ -barril terminal de unión a membrana. Tiene un dominio de unión a peptidoglicano en C-terminal cuya función parece ser la unión de la membrana externa a la capa de peptidoglicano,<sup>139</sup> que parece tener un papel fundamental en la localización y estabilización en membrana de PorA, PorB y otras proteínas de membrana externa.

---

<sup>137</sup> **Klugman KP, Gotschlich EC, Blake MS.** Sequence of the structural gene (*rmpM*) for the class 4 outer membrane protein of *Neisseria meningitidis*, homology of the protein to gonococcal protein III and *Escherichia coli* OmpA, and construction of meningococcal strains that lack class 4 protein. *Infect Immun.* 1989; 57: 2066–2071.

<sup>138</sup> **Prinz T, Tommassen J.** Association of iron-regulated outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis* with RmpM (class 4) protein. *FEMS Microbiol Lett.* 2000; 183: 49–53.

<sup>139</sup> **Grizot S, Buchanan SK.** Structure of the OmpA-like domain of RmpM from *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol.* 2004; 51: 1027–1037.

La RmpM es un buen candidato para el desarrollo de vacunas, pues se ha propuesto su implicación en la patogénesis del meningococo,<sup>140</sup> aunque también aparece en cepas comensales<sup>141</sup> y aunque en principio se consideró que los anticuerpos específicos contra ella que podían bloquear la actividad bactericida de los anticuerpos dirigidos contra las proteínas de clase 1, 2 y 3 afectando negativamente a la inmunogenicidad de las vacunas basadas en proteínas de membrana externa,<sup>142</sup> en trabajos posteriores se demostró que no existe tal bloqueo.<sup>143</sup>

- La **Omp85** juega un papel directo en el ensamblaje de proteínas<sup>82,144</sup> y, posiblemente, lípidos<sup>145,146</sup> de membrana externa. Es una proteína de unos 88 kDa, evolutivamente conservada y presente en el genoma de todos los Gram-negativos

---

<sup>140</sup> **Wolff K, Stern A.** Identification and characterization of specific sequences encoding pathogenicity associated proteins in the genome of commensal *Neisseria* species. *FEMS Microbiol Lett.* 1995; 125: 255–264.

<sup>141</sup> **Troncoso G, Sánchez S, Kolberg J, Rosenqvist E, Veiga M et al.** Analysis of the expression of the putatively virulence-associated neisserial protein RmpM (class 4) in commensal *Neisseria* and *Moraxella catarrhalis* strains. *FEMS Microbiol Lett.* 2001; 199: 171–176.

<sup>142</sup> **Munkley A, Tinsley CR, Virji M, Heckels JE.** Blocking of bactericidal killing of *Neisseria meningitidis* by antibodies directed against class 4 outer membrane protein. *Microb Pathog.* 1991; 11: 447–452.

<sup>143</sup> **Rosenqvist E, Musacchio A, Aase A, Høiby A, Namork E et al.** Functional activities and epitope specificity of human and murine antibodies against the class 4 outer membrane protein (rmp) of *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun.* 1999; 67: 1267–1276.

<sup>144</sup> **Wu T, Malinverni J, Ruiz N, Kim S, Silhavy TJ et al.** Identification of a multicomponent complex required for outer membrane biogenesis in *Escherichia coli*. *Cell.* 2005; 121: 235–245.

<sup>145</sup> **Genevrois S, Steeghs L, Roholl P, Letesson JJ, van der Ley P.** The Omp85 protein of *Neisseria meningitidis* is required for lipid export to the outer membrane. *EMBO J.* 2003; 22: 1780–1789.

<sup>146</sup> **Doerrler WT, Raetz CR.** Loss of outer membrane proteins without inhibition of lipid export in an *Escherichia coli* YaeT mutant. *J Biol Chem.* 2005; 280: 27679–27687.

secuenciados hasta el momento<sup>147</sup> y en las mitocondrias de las células eucariotas.

- **PilQ:** Es una proteína integral de membrana externa de Pm en torno a 80 kDa perteneciente a la superfamilia GSP de secretinas<sup>148</sup> que interviene en el proceso de ensamblaje de los pili tipo IV permitiendo su translocación a través de la membrana externa mediante un mecanismo activo que implica la existencia de una respuesta dinámica por interacción con la sustancia secretada.<sup>149</sup>
- **Proteínas que forman parte de sistemas de transporte.**
  - Las TpsB son proteínas integrales de membrana externa con un peso molecular aproximado de 60 kDa con estructura en  $\beta$ -barril<sup>150,151</sup> que forman complejos tetaméricos.<sup>152</sup> Pertenecen a la subclase de las TpsBs secretoras de hemolisina/citolisina<sup>153</sup> y forman parte del mecanismo de secreción TPS, específico para proteínas y péptidos de gran tamaño.

<sup>147</sup> **Bredemeier R, Schlegel T, Ertel F, Vojta A, Borissenko L et al.** Functional and phylogenetic properties of the pore-forming beta-barrel transporters of the Omp85 family. *J Biol Chem.* 2007; 282: 1882–1890.

<sup>148</sup> **Pugsley AP.** The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol Rev.* 1993; 57: 50–108.

<sup>149</sup> **Collins RF, Frye SA, Balasingham S, Ford RC, Tonjum T et al.** Interaction with type IV pili induces structural changes in the bacterial outer membrane secretin PilQ. *J Biol Chem.* 2005; 280: 18923–18930.

<sup>150</sup> **Guédin S, Willery E, Tommassen J, Fort E, Drobecq H et al.** Novel topological features of FhaC, the outer membrane transporter involved in the secretion of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. *J Biol Chem.* 2001; 275: 30202–30210.

<sup>151</sup> **Könninger UW, Hobbie S, Benz R, Braun V.** The haemolysin-secreting ShlB protein of the outer membrane of *Serratia marcescens*: determination of surface-exposed residues and formation of ion-permeable pores by ShlB mutants in artificial lipid bilayer membranes. *Mol Microbiol.* 1999; 32: 1212–1225.

<sup>152</sup> **Surana NK, Grass S, Hardy GG, Li H, Thanassi DG et al.** Evidence for conservation of architecture and physical properties of Omp85-like proteins throughout evolution. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101: 14497–14502.

<sup>153</sup> **Jacob-Dubuisson F, Locht C, Antoine R** Two-partner secretion in Gram-negative bacteria: a thrifty, specific pathway for large virulence proteins. *Mol Microbiol.* 2001; 1: 306–313.

- Los **sistemas de secreción de tipo I** requieren una maquinaria compuesta por multímeros de tres proteínas: Una proteína integral de membrana externa, un transportador ABC y un adaptador o proteína de fusión de membrana anclada en la membrana interna y con un gran dominio periplásmico.<sup>154,155</sup> Esta maquinaria atraviesa toda la envoltura celular, de modo que la secreción ocurre en un único paso, directamente desde el citoplasma al medio intercelular.
- **Laz** (lipid-modified azurin):<sup>156</sup> La azurina es una proteína pequeña (17 kDa) y azul que contiene cobre en su estructura y que actúa en el transporte de electrones durante la respiración en varios microorganismos. En *N. meningitidis*, Laz está anclada a la membrana externa por el ácido graso palmitil y posee un dominio N-terminal que coincide con el encontrado en la proteína H.8,<sup>157,158</sup> que es común a todas las *Neisseria* patógenas<sup>159</sup>. La función de las Laz es controvertida. Se sabe que no son esenciales para el crecimiento y que están implicadas en la respuesta contra el stress provocado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediante un

---

<sup>154</sup> **Delepelaire P.** Type I secretion in Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1694: 149–161.

<sup>155</sup> **Young J , Holland IB.** ABC transporters: bacterial exporters – revisited five years on. *Biochem Biophys Acta*. 1999; 1461: 177–200.

<sup>156</sup> **Woods JP, Dempsey JF, Kawula TH, Barritt DS, Cannon JG.** Characterization of the neisserial lipid-modified azurin bearing the H.8 epitope. *Mol Microbiol*. 1989; 3: 583–591.

<sup>157</sup> **Gotschlich EC, Seiff ME.** Identification and gene structure of an azurin-like protein with a lipoprotein signal peptide in *Neisseria gonorrhoeae*. *FEMS Microbiol Lett*. 1987; 43: 253–255.

<sup>158</sup> **Kawula TH, Spinola SM, Klapper DG, Cannon JG.** Localization of a conserved epitope and an azurin-like domain in the H.8 protein of pathogenic *Neisseria*. *Mol Microbiol*. 1987. 1: 179–185.

<sup>159</sup> **Cannon JG.** Conserved lipoproteins of pathogenic *Neisseria* species bearing the H.8 epitope: lipid-modified azurin and H.8 outer membrane protein. 1989. *Clin Microbiol Rev*. 2: S1–S4.



mecanismo desconocido.<sup>160</sup> Estudios recientes han sugerido la posibilidad de que el epitopo H.8 pueda tener alguna función en la ruptura de la barrera hematoencefálica durante el proceso de infección.<sup>161</sup>

### 3.6 Papel en el funcionamiento celular de las interacciones entre proteínas de membrana externa

Las proteínas de membrana externa están en contacto estrecho con los lípidos, formando complejos con ellos. En muchos casos, estas proteínas forman además otro tipo de complejos en cuya composición intervienen distintas subunidades proteicas y cofactores y que se denominan complejos de proteínas de membrana externa.

Se ha estimado que en torno a un 80% de las proteínas<sup>162</sup> ejercen su función por medio de interacciones estables o transitorias con otras proteínas formando complejos proteicos homo- o heterooligoméricos. Esta característica puede atribuirse al llamado “abarroamiento macromolecular” existente en el interior de las células, donde entre el 20 y el 30% del volumen intracelular está ocupado por macromoléculas que no son directamente accesibles por otras macromoléculas, lo que favorece la interacción entre macromoléculas y su segregación en distintos compartimentos.<sup>163,164</sup> Estas características son especialmente relevantes en

<sup>160</sup> **Wu HJ, Seib KL, Edwards JL, Apicella MA, McEwan AG et al.** Azurin of pathogenic *Neisseria* spp. is involved in defense against hydrogen peroxide and survival within cervical epithelial cells. *Infect Immun.* 2005; 73: 8444–8448

<sup>161</sup> **Hong CS, Yamada T, Hashimoto W, Fialho AM, Das Gupta TK et al.** Disrupting the entry barrier and attacking brain tumors: the role of the *Neisseria* H.8 epitope and the Laz protein. *Cell Cycle.* 2006; 5: 1633–41.

<sup>162</sup> **Berggård T, Linse S, James P.** Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions. *Proteomics.* 2007; 7: 2833–2842.

<sup>163</sup> **Zimmerman SB, Minton AP.** Macromolecular crowding: biochemical, biophysical, and physiological consequences. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 1993; 22: 27–65.

las membranas biológicas, pues son los compartimentos celulares en los que hay una mayor concentración de biomoléculas.<sup>165,166</sup>

Los complejos supramoleculares en los que dos o más proteínas separadas que se unen de forma permanente o transitoria son elementos regulatorios importantes. En algunos casos, el complejo resultante no sólo es la suma de las proteínas que lo forman, sino que el ensamblaje es necesario para que éste lleve a cabo su función, mientras que en otros casos la unión es favorable, pero no obligatoria. La organización de las proteínas funcionalmente ligadas en complejos parece ser un principio general debido a sus importantes ventajas funcionales. Se han estudiado numerosos complejos de proteínas de membrana importantes para el metabolismo celular, tal es el caso de los implicados en la cadena de transporte electrónico mitocondrial (complejos I, II, III, IV y V), en la fotosíntesis (fotosistemas I Y II, complejo antena) o en el metabolismo del nitrógeno (complejos de la nitrogenasa, complejo transportador de nitrato, complejo fijador de nitrógeno) entre otros. Las interacciones transitorias entre proteínas también están relacionadas con procesos de regulación y de transporte de proteínas a través de la membrana. El estudio de este tipo de complejos es mucho más difícil debido a que todas las proteínas y condiciones necesarias para la formación del complejo han de ser identificadas de modo previo a la caracterización del mismo.

---

<sup>164</sup> **Ellis RJ.** Macromolecular crowding: obvious but underappreciated. *Trends Biochem Sci.* 2001; 26: 597–604.

<sup>165</sup> **Vereb G, Szöllosi J, Matkó J, Nagy P, Farkas T et al.** Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100: 8053–8058.

<sup>166</sup> **Gilkerson RW, Selker JM, Capaldi RA.** The cristal membrane of mitochondria is the principal site of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett.* 2003; 546: 355–358.

**Objetivos e interés del trabajo.**



La enfermedad meningocócica es todavía un serio problema para la salud pública, ya que pese al éxito obtenido con la vacuna polisacáridica conjugada de serogrupo C, introducida en el Reino Unido a finales de 1999 e incluida en el calendario vacunal infantil en España en el año 2000, no existe ninguna vacuna efectiva para la prevención de la enfermedad meningocócica de serogrupo B, causante de la mayoría de los casos en Europa.

El polisacárido capsular de serogrupo B es poco inmunogénico y genera autotolerancia como consecuencia de su similitud con el ácido polisialílico presente en las células neuronales humanas. Este hecho ha centrado la búsqueda de una vacuna contra dicho serogrupo en las proteínas de la membrana externa, y en especial, en las proteínas de Clase 1 o PorA. Según se ha descrito hasta el momento, se trata de porinas que se agrupan en la superficie de la membrana externa formando poros compuestos por homotrímeros, probablemente estabilizados por la presencia de la proteína de Clase 4 o RmpM. Al igual que en el caso de las PorA, las proteínas de Clase 3 o PorB también se encontrarían en la superficie bacteriana formando poros a modo de complejos homotriméricos. El estudio de la estructura de estos complejos ha sido realizado prácticamente en su totalidad empleando cepas mutantes o mediante la expresión en forma de proteínas de fusión, técnica que precisa de un proceso de desnaturalización-renaturalización. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio, parecen indicar que en las cepas no modificadas genéticamente, estas proteínas se encuentran en realidad formando únicamente poros heterotriméricos, es decir poros en los que junto con la RmpM están presentes los dos tipos de porinas. Este hecho no es trivial, ya que las asociaciones que se produzcan pueden determinar la formación de epitopos no lineales que serían muy importantes, puesto que se ha comprobado que los conformacionales o los compartidos son de gran relevancia en el desarrollo de la respuesta inmunitaria. Un mayor conocimiento de la

conformación nativa de las proteínas de membrana externa, así como la interacción y relación entre ellas podría aportar las claves necesarias para identificar antígenos con esta clase de epitopos, lo que supondría un avance definitivo en el desarrollo de una vacuna eficaz contra la enfermedad meningocócica, especialmente contra el serogrupo B en el que las proteínas de membrana externa son las principales dianas de la respuesta inmunitaria. Por ello, teniendo en cuenta que las porinas de *Neisseria meningitidis* son proteínas mayoritarias en la membrana externa, y puesto que las PorA son el componente principal de varias de las vacunas en desarrollo actualmente es necesario estudiar la relación exacta entre estas dos proteínas en condiciones naturales en la bacteria.

## OBJETIVOS

La colaboración con otros grupos de investigación nos ha permitido disponer de mutantes “knock-out” (mutantes en los que se ha eliminado un gen o una parte crucial del mismo con el fin de evitar su expresión funcional) que no expresan la proteína PorA, la PorB o la RmpM. Así pues, el objetivo de este estudio es la comparación de la utilidad de distintos tipos de técnicas electroforéticas bidimensionales para el estudio tanto del proteoma de membrana como de los complejos formados en la misma en este tipo de cepas, con el fin de comparar los resultados con los obtenidos previamente en cepas no modificadas y en cepas de la especie comensal *N. lactamica*.

Los objetivos concretos planteados en este trabajo fueron los siguientes:

1. Estudiar el proteoma de membrana externa de cepas patógenas de *N. meningitidis* y de la especie comensal *N. lactamica* mediante el uso de

- electroforesis bidimensional IEF/SDS-PAGE e identificar las proteínas separadas por MALDI-TOF.
2. Analizar los complejos de porinas presentes en cepas patógenas de *N. meningitidis* y de la especie comensal *N. lactamica* utilizando electroforesis bidimensional diagonal dSDS-PAGE.
  3. Analizar los complejos presentes en estas mismas cepas en condiciones nativas mediante el uso de electroforesis bidimensional Blue Native-SDS-PAGE.
  4. Estudiar el proteoma de membrana externa de los mutantes “knock-out” mediante análisis en electroforesis bidimensional IEF/SDS-PAGE.
  5. Analizar los complejos de porinas presentes en los mutantes “knock-out” utilizando electroforesis diagonal bidimensional (dSDS-PAGE).
  6. Analizar los complejos presentes en dichos mutantes en condiciones nativas mediante el uso de electroforesis bidimensional Blue Native-SDS-PAGE.
  7. Comparar los resultados obtenidos en las cepas salvajes y mutantes.
  8. Comparar los resultados obtenidos utilizando cada una de las técnicas.





**CAPÍTULO I: Análisis del proteoma de membrana externa  
mediante electroforesis bidimensional  
IEF/SDS-PAGE**



## 1. Introducción

### 1.1 Isoelectroenfoque

La electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D PAGE) es una herramienta útil para el análisis de mezclas complejas de proteínas. Esta técnica, descrita originalmente por O'Farrell<sup>167</sup> separa las proteínas en base a su punto isoeléctrico (pI) en la primera dimensión y según su masa molecular aparente en la segunda. En la primera dimensión las proteínas son separadas en un gradiente de pH hasta alcanzar una posición en la que su carga neta es cero, lo que define su punto isoeléctrico. En una segunda dimensión las proteínas son separadas mediante electroforesis en presencia de SDS. La alta resolución de la técnica se debe a que las dos separaciones se basan en parámetros independientes.

La innovación clave para la 2D-PAGE fue el desarrollo de geles con un gradiente de pH inmovilizado (IPG)<sup>168</sup> pues éste elimina los problemas de inestabilidad del gradiente y baja capacidad de carga derivados del uso de gradientes de pH preparados con anfólitos transportadores. En los geles IPG, el gradiente es generado por las llamadas inmovilinas y está copolimerizado con la matriz de acrilamida del gel. Este sistema ha permitido mejorar la resolución y reproducibilidad de los geles así como aumentar la cantidad de proteína que puede ser cargada, lo que ha hecho posible la comparación de mapas entre distintos laboratorios, facilitando el intercambio de información y convirtiendo a esta técnica en el estándar

---

<sup>167</sup> O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem.* 1975; 250: 4007–4021.

<sup>168</sup> Wilkins MR, Williams KL, Appel RD, Hochstrasser DF. (eds). *Proteome research: New frontiers in functional genomics.* 1997. Springer-Verlag, Berlin

para el análisis proteómico.<sup>169</sup> Tras la separación, la identificación de las proteínas puede realizarse utilizando diversos métodos, como el uso de anticuerpos específicos, la comparación de las posiciones, análisis de la composición aminoacídica o la espectrometría de masas.

La existencia de programas informáticos que permiten la comparación de imágenes de 2D-PAGE facilita la identificación y cuantificación de manchas de proteínas en diferentes muestras a la vez que permite el procesamiento de grandes cantidades de geles.

La aplicación principal de la 2D-PAGE es la proteómica de expresión. En esta aproximación, la expresión de proteínas de dos muestras se puede comparar de forma cualitativa y cuantitativa. La aparición o desaparición de manchas proporciona información sobre la expresión diferencial de proteínas mientras que la intensidad de las mismas permite conocer sus niveles de expresión. Para realizar estos estudios se pueden utilizar tanto organismos completos como líneas celulares o fluidos biológicos. Este método de trabajo permite la comparación de tejidos normales con tejidos enfermos o la de células tratadas con drogas o sometidas a diferentes estímulos.

Otra aplicación importante es la proteómica del mapa celular, donde la 2D-PAGE se utiliza para hacer mapas de proteínas de microorganismos, orgánulos celulares y complejos de proteínas.

El mayor problema de este método a la hora de llevar a cabo análisis de proteínas de membrana radica en que presenta un sesgo

---

<sup>169</sup> **Righetti PG.** The Alpher, Bethe and Gamow of IEF, the alpha-Centauri of electrokinetic methodologies. Part II: immobilized pH gradients. *Electrophoresis*. 2007; 28: 545–555.

importante respecto a las proteínas hidrofóbicas, de modo que la eficiencia de la separación disminuye al aumentar la hidrofobicidad.<sup>170</sup> Este efecto se debe a que los detergentes iónicos fuertes, capaces de solubilizar este tipo de proteínas, son incompatibles con la técnica porque la presencia de altas concentraciones de iones interfiere en la migración de las proteínas en los geles IPG. Para evitar este problema, el tampón de solubilización utilizado para el IEF lleva urea y tiourea como agentes caotrópicos y detergentes no cargados o zwitteriónicos,<sup>171,172</sup> que no son los más adecuados para su utilización con proteínas de membrana pues tanto su capacidad para extraerlas del entorno lipídico como para mantener su solubilidad es menor que la de los detergentes iónicos.

Otro factor a tener en cuenta es que la solubilidad de las proteínas disminuye cuando nos acercamos a su punto isoelectrico, provocando la agregación y precipitación de las proteínas durante el isoelectroenfoque y obstaculizando la transferencia desde la matriz IPG al gel de la segunda dimensión, lo que ocasiona la pérdida de proteínas y dificulta su correcta visualización, cuantificación e identificación.<sup>173</sup>

Se han realizado múltiples estudios en los que se intenta disminuir estos efectos mediante la utilización de distintas aproximaciones,

---

<sup>170</sup> **Santoni V, Molloy M, Rabilloud T.** Membrane proteins and proteomics: un amour impossible? *Electrophoresis*. 2000; 21: 1054–1070.

<sup>171</sup> **Görg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B et al.** The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*. 2000; 21: 1037–1053

<sup>172</sup> **Görg A, Weiss W, Dunn MJ.** Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*. 2004; 4: 3665–3685.

<sup>173</sup> **Klein C, Garcia-Rizo C, Bisle B, Scheffer B, Zischka H et al.** The membrane proteome of *Halobacterium salinarum*. *Proteomics*. 2005; 5: 180–197.

comprobándose que el uso de detergentes como el Triton X-100, N-dodecyl- $\beta$ -D-maltosido o ASB14, la deslipidación,<sup>174</sup> el enriquecimiento a partir de muestras complejas mediante distintos métodos,<sup>175</sup> su prefraccionamiento en membranas isoelectricas<sup>176</sup> o el uso de tiras IPG con un tamaño de poro grande<sup>177</sup> permiten aumentar la resolución. También se ha probado la utilización técnicas de IEF alternativas que no utilizan matrices hidrofóbicas de poliacrilamida, tal es el caso de la FF-IEF (free-flow IEF)<sup>178</sup> o la electroforesis capilar.<sup>179</sup> Aunque ninguna de estas aproximaciones resuelve totalmente el problema, y éste es especialmente patente en las proteínas muy hidrofóbicas con tres o más regiones transmembrana,<sup>175,172</sup> con estas modificaciones el método resulta adecuado para la separación de las proteínas asociadas a la membrana o de las proteínas menos hidrofóbicas, por lo que ha sido utilizado con frecuencia para el análisis del proteoma de membrana externa de bacterias,<sup>180</sup> donde la proporción de proteínas tipo porina, con estructura en  $\beta$ -barril y menor hidrofobicidad, es alta.

---

<sup>174</sup> **Zhang L, Xie J, Wang X, Liu X, Tang X et al.** Proteomic analysis of mouse liver plasma membrane: use of differential extraction to enrich hydrophobic membrane proteins. *Proteomics*. 2005; 5: 4510–4524.

<sup>175</sup> **Mattow J, Siejak F, Hagens K, Schmidt F, Koehler C et al.** An improved strategy for selective and efficient enrichment of integral plasma membrane proteins of *mycobacteria*. *Proteomics*. 2007; 7: 1687–1701.

<sup>176</sup> **Pedersen SK, Harry JL, Sebastian L, Baker J, Traini MD et al.** Unseen proteome: mining below the tip of the iceberg to find low abundance and membrane proteins. *J Proteome Res*. 2003; 2: 303–311.

<sup>177</sup> **Bruschi M, Musante L, Candiano G, Ghiggeri GM, Herbert B et al.** Soft immobilized pH gradient gels in proteome analysis: a follow-up. *Proteomics*. 2003; 3: 821–825.

<sup>178</sup> **Obermaier C, Jankowski V, Schmutzler C, Bauer J, Wildgruber R et al.** Free-flow isoelectric focusing of proteins remaining in cell fragments following sonication of thyroid carcinoma cells. *Electrophoresis*. 2005; 26: 2109–2116.

<sup>179</sup> **Busnel JM, Varenne A, Descroix S, Peltre G, Gohon Y et al.** Evaluation of capillary isoelectric focusing in glycerol-water media with a view to hydrophobic protein applications. *Electrophoresis*. 2005; 26: 3369–3379.

<sup>180</sup> **Braun RJ, Kinkl N, Beer M, Ueffing M.** Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins. *Anal Bioanal Chem*. 2007; 389: 1033–1045.

En el caso concreto de *N. meningitidis* serogrupo B, la aproximación por 2D-PAGE ha sido utilizada tanto para la elaboración de un mapa de referencia extensivo<sup>181</sup> como en diversos intentos para dilucidar el repertorio de proteínas de membrana destinados a la identificación de candidatos vacunales.<sup>182,183</sup> Este método también se utiliza para el análisis de la composición de vacunas basadas en OMVs.<sup>184</sup>

En este estudio pretendemos utilizar la separación por 2D IEF/SDS-PAGE para elaborar mapas proteómicos e inmunoproteómicos y para la consiguiente identificación de las proteínas de membrana externa en las cepas indicadas en la **tabla 3**.

---

<sup>181</sup> **Schauder S, Penna L, Ritton A, Manin C, Parker F et al.** Proteomics analysis by two-dimensional differential gel electrophoresis reveals the lack of a broad response of *Neisseria meningitidis* to in vitro-produced AI-2. *J Bacteriol.* 2005; 187: 392–395.

<sup>182</sup> **Vaughan TE, Skipp PJ, O'Connor CD, Hudson MJ, Vipond R et al.** Proteomic analysis of *Neisseria lactamica* and *Neisseria meningitidis* outer membrane vesicle vaccine antigens. *Vaccine.* 2006; 24: 5277–5293.

<sup>183</sup> **Post DM, Zhang D, Eastvold JS, Teghanemt A, Gibson BW et al.** Biochemical and functional characterization of membrane blebs purified from *Neisseria meningitidis* serogroup B. *J Biol Chem.* 2005; 280: 38383–38394

<sup>184</sup> **Uli L, Castellanos-Serra L, Betancourt L, Domínguez F, Barberá R et al.** Outer membrane vesicles of the VA-MENGOC-BC vaccine against serogroup B of *Neisseria meningitidis*: Analysis of protein components by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics.* 2006; 6: 3389–3399.





## 2. Material y métodos

### 2.1 Cepas bacterianas, origen, características, conservación y cultivo.

#### 2.1.1 Cepas bacterianas: Origen y características.

Las cepas bacterianas del género *Neisseria* utilizadas en el presente estudio (**tabla 3**) proceden de la colección del Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia (Universidad de Santiago de Compostela). La cepa *N. meningitidis* Nm30 fue aislada del líquido cefalorraquídeo de un paciente del antiguo Hospital Xeral de Santiago; las cepas *N. meningitidis* B16B6 y M982 son cepas tipo ampliamente utilizadas en la investigación del meningococo; *N. meningitidis* 2851 (H44/76) es una cepa aislada a partir de un paciente con enfermedad meningocócica invasiva.<sup>185</sup> El Instituto Nacional Noruego de Salud Pública (NIPH) ha desarrollado una vacuna monovalente contra el serogrupo B basada en OMVs de esta cepa (MenBvac).<sup>43</sup> En este estudio se utilizaron varios mutantes “knock-out” de esta cepa que no expresan la proteína PorA (3050), la PorB (3103), la RmpM (2851 RmpM-) o la FetA (3043). La cepa salvaje y los mutantes PorA-, PorB- y FetA- fueron amablemente cedidos por el Dr. IM Feavers (Division of Bacteriology, National Institute for Biological Standards and Control, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire EN6 3QG, United Kingdom.), y el mutante para RmpM fue cedido por el Dr. E. Rosenqvist (Division of Infectious Disease Control, Norwegian Institute of Public Health (NIPH), P.O. Box 4404, Nydalen, N-0403 Oslo, Norway). La cepa *N. meningitidis* 3059 y sus mutantes (3091 y 3094) también fueron cedidas por el Dr. IM Feavers.

<sup>185</sup> **Holten E.** Serotypes of *Neisseria meningitidis* isolated from patients in Norway during the first six months of 1978. *J Clin Microbiol.* 1979; 9: 186–188.

Las cepas de *N. lactamica* NIP0, NIP2 y NIP5 proceden de la orofaringe de individuos sanos de nuestra Comunidad Autónoma.

Todas las cepas fueron identificadas en su momento por los métodos habituales: morfología de las colonias, prueba de la oxidasa, tinción de Gram y pruebas de fermentación de azúcares en medio agar base de tripticasa-cistina (Difco Laboratories, Detroit, MI, Estados Unidos) con glucosa, maltosa, lactosa, sacarosa y fructosa.

La caracterización de las cepas de *N. meningitidis* (serogrupo, serotipado, serosubtipado y MLST) se realizó en el Laboratorio de Referencia de Meningococos del Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda (Madrid).

La caracterización de las cepas de *N. lactamica* se realizó empleando los sistemas de identificación API.

**Tabla 3:** Características de las cepas estudiadas

Especie	Cepa	Origen	Serogrupo	Serotipo/ subtipo	ST/ Complejo clonal
<i>N. meningitidis</i>	B16B6	Cepa de referencia	B	2a:P1.2	ST-11, ET-37
<i>N. meningitidis</i>	M982	Cepa de referencia	B	9:P1.9	ST-5
<i>N. meningitidis</i>	Nm30	LCR	C	2b:P1.2	ST-8, A4
<i>N. meningitidis</i>	2851	H44/76	B	15:P1.7,16	ST-32,ET-5
<i>N. meningitidis</i>	3050	Mutante <i>Knock-out</i> (2851 PorA-)	B	15: (-)	ST-32,ET-5
<i>N. meningitidis</i>	3103	Mutante <i>Knock-out</i> (2851 PorB-)	B	(-):P1.7,16	ST-32,ET-5
<i>N. meningitidis</i>	3043	Mutante <i>Knock-out</i> (2851 FetA-)	B	15:P1.7,16	ST-32,ET-5
<i>N. meningitidis</i>	2851 RmpM-	Mutante <i>Knock-out</i> (2851 RmpM-)	B	15:P1.7,16	ST-32,ET-5
<i>N. meningitidis</i>	3059		B	NT:P1.22, 9	ST-275, Burst 1
<i>N. meningitidis</i>	3091	Mutante <i>Knock-out</i> (3059 PorA-)	B	NT: (-)	ST-275, Burst 1
<i>N. meningitidis</i>	3094	Mutante <i>Knock-out</i> (3059 Por B-)	B	(-):P1.22,9	ST-275, Burst 1
<i>N. lactamica</i>	NIP0	Orofaringe	N.A	N.A	
<i>N. lactamica</i>	NIP2	Orofaringe	N.A	N.A	
<i>N. lactamica</i>	NIP5	Orofaringe	N.A	N.A	

### 2.1.2 Conservación.

Las cepas se conservaron en leche descremada estéril al 10% (p/v) a -80° C, para lo cual se hizo un césped en una placa de Choc-Iso a partir de una colonia aislada y se cultivó a 37° C con un 5% CO<sub>2</sub> durante 8 horas, tras las cuales el cultivo fue resuspendido en leche descremada y distribuido en alícuotas de 300 µl.

### 2.1.3 Condiciones de cultivo.

Tras la descongelación a temperatura ambiente del vial correspondiente a cada cepa se procedió a su aislamiento en placas de medio Choc-Iso (medio GC agar base, hemoglobina al 1% (p/v) y Biovitex al 1% [Biolife, Milán, Italia] (McGee *et al*, 1979)<sup>186</sup> que fueron incubadas durante 24 horas a 37° C en presencia de CO<sub>2</sub> al 5%. A partir de una colonia aislada se sembró un césped en una placa de este mismo medio y se mantuvo 8 horas en idénticas condiciones. El césped se utilizó posteriormente para preparar una suspensión bacteriana densa (con valores de absorbancia a 540 nm comprendidos entre 1.6 y 1.8) en medio Mueller-Hinton líquido (Oxoid, Unipath Ltd, Basingstoke, Hampshire, Reino Unido). La suspensión se utilizó para inocular medio Mueller-Hinton en el que previamente se habían inducido condiciones de restricción de hierro mediante la adición de desferal (deferroxamina mesilato, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, Estados Unidos) a una concentración final de 1 µM. Los matraces Erlenmeyer de 1L de capacidad conteniendo 400 ml de cultivo se incubaron durante 12-14 h a 37° C con agitación de 100 rpm.

### 2.2 *Extracción de vesículas de membrana externa (OMVs).*

Durante la fase logarítmica de su crecimiento, el meningococo sintetiza una mayor cantidad de membrana originando unas estructuras a modo de vesículas que son liberadas de la superficie externa de la bacteria hacia el medio circundante. La forma y tamaño varían dependiendo de la cepa, pudiendo aparecer desde pequeñas vesículas

---

<sup>186</sup> McGee ZA, Street CH, Chappell CL, Cousar ES, Morris F *et al*. Pili of *Neisseria meningitidis*: effect of media on maintenance of piliation, characteristics of Pili, and colonial morphology. *Infect Immun*. 1979; 24: 194–201.

redondas de aproximadamente 25 nm de diámetro hasta grandes estructuras tubulares. Al estar formadas por membrana externa, las OMVs se utilizan como fuente para la obtención de las proteínas de la misma.

Las vesículas de membrana externa se obtuvieron por extracción con cloruro de litio, según el protocolo descrito por Gómez *et al.*<sup>187</sup> o bien una utilizando una variación del mismo en que se omite la incubación en cloruro de litio. Los matraces conteniendo las bacterias procedentes del cultivo en medio Mueller-Hinton se incubaron 1 hora a 56° C. Las células se recogieron por centrifugación a 10000  $\times$  g durante 10 minutos a 4° C y se resuspendieron en tampón acetato 0.1 M, pH 5.8, conteniendo cloruro de litio 0.2 M, a razón de 5 ml de tampón por gramo de células. Las suspensiones bacterianas resultantes se incubaron a 45° C con una agitación de 100rpm durante 2 horas. En los casos en los que no se utilizó cloruro de litio, el botón celular se resuspendió en agua destilada (4ml por gramo de peso húmedo). A continuación se pasaron 3 veces por la prensa de French a una presión de 16000 lb/in<sup>2</sup> para favorecer la extracción de las vesículas de membrana externa. Los restos celulares se retiraron por centrifugación a 10000  $\times$  g durante 10 minutos a 4° C y el sobrenadante se sometió a 20000  $\times$  g durante 10 minutos a la misma temperatura. Las OMVs así obtenidas se resuspendieron en agua destilada con dos pulsos de ultrasonidos de 5 segundos cada uno, obteniéndose una solución cuyo contenido en proteína se determinó por

---

<sup>187</sup> **Gómez JA, Criado MT, Ferreirós CM.** Bactericidal activity of antibodies elicited against the *Neisseria meningitidis* 37-kDa ferric binding protein (FbPA) with different adjuvants. *FEMS Immunol Med Microb.* 1997; 20: 79–86.

el método de BCA siguiendo las instrucciones del fabricante<sup>188</sup> (BCA Protein Assay Reagent, Pierce, Rockford, IL, Estados Unidos).

### 2.3 *Obtención y conservación de sueros.*

#### 2.3.1 Obtención y conservación de sueros de ratón.

Para la obtención de los sueros hiperinmunes de ratón se utilizaron como antígenos OMVs extraídas de cultivos en condiciones de restricción de hierro de las diferentes cepas (Nm30, B16B6, NIP2 y NIP5). El protocolo de inmunización fue el siguiente:

Los diferentes grupos de ratones fueron inmunizados mediante la administración, a intervalos de 2 semanas, de 3 dosis consistentes en:

- Día 0: 20µg de OMVs suspendidas en 100 µl de adyuvante de Freund completo. Inyección intraperitoneal.
- Día 14: 20µg de OMVs suspendidas en 100 µl de adyuvante de Freund incompleto. Inyección intraperitoneal
- Día 24: 20µg de OMVs suspendidas en 100 µl de adyuvante de Freund incompleto. Inyección intraperitoneal

La sangre fue extraída transcurridos 5 días desde la administración de la última dosis de antígenos. Se dejó coagular 1 hora a temperatura ambiente y se mantuvo durante 3 horas a 4° C para permitir la retracción del coágulo. El suero fue retirado mediante centrifugación (2000 x g, 10 minutos a 4° C) y posteriormente inactivado por calentamiento a 56 ° C durante 30 minutos. Los sueros se conservaron a -20° C en alícuotas de 100 µl.

---

<sup>188</sup> **Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallic AK, Gartner MD et al.** Measurement of protein using bicinchononic acid. *Anal Biochem.* 1985; 150: 76–78.

### 2.3.2 Obtención y conservación de sueros de conejo.

Los dos sueros hiperinmunes de conejo utilizados para este estudio se obtuvieron mediante la inyección de cuatro dosis de OMVs obtenidas a partir del cultivo de la cepa Nm30 en condiciones de restricción de hierro y de la proteína de membrana P47 previamente purificada, respectivamente.

Se procedió según el siguiente protocolo de inmunización:

- Día 0: Se procedió a la inyección por vía subdérmica de:
  - Nm30: 500 µg de antígeno suspendidos en adyuvante de Freund completo para alcanzar un volumen final de 500 µl.
  - P47: Aproximadamente 13 mg de precipitado de proteína concentrada con TCA (ácido tricloroacético) al 10%, resuspendida en 125 µl de tampón PBS pH 7.2 y con el pH ajustado a 7 con NaOH, suspendido todo ello en adyuvante de Freund completo para conseguir un volumen final de 500 µl.
- Día 54: 500 µg de OMVs de Nm30 ó 13 mg de proteína P47. suspendidos en 100 µl de PBS. Inyección intramuscular.
- Día 62: 500 µg de OMVs de Nm30 ó 13 mg de proteína P47. suspendidos en 100 µl de PBS. Inyección intramuscular.
- Día 70: 500 µg de OMVs de Nm30 ó 13 mg de proteína P47. suspendidos en 100 µl de PBS. Inyección intramuscular.

La sangre fue extraída por punción cardiaca 12 días después de la administración de la última dosis de antígenos. Se dejó coagular 1 hora a temperatura ambiente y se mantuvo a 4° C durante 3 horas para permitir la retracción del coágulo. El suero se retiró por centrifugación (2000 x g, 10 minutos a 4° C) y fue posteriormente inactivado por calentamiento a 56 ° C durante 30 minutos. Los sueros se conservaron a -20° C en alícuotas de 300 µl.

### 2.3.3 Otros sueros.

El suero específico para la proteína de membrana RmpM mAb 185, H-8, fue producido y caracterizado en el Instituto Nacional de Salud Pública de Oslo (Noruega)<sup>143</sup> y amablemente cedido por el Dr. Jan Kolberg. El suero monoclonal anti-PorA 9-1-P1.c fue facilitado por la Dra. Elizabeth Moran (Walter Reed Army Institute, USA)

## 2.4 *Técnicas electroforéticas.*

### 2.4.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Se realizó utilizando geles verticales de poliacrilamida en presencia del detergente aniónico dodecil-sulfato sódico (SDS), utilizando el sistema de tampón discontinuo de Laemli<sup>189</sup>. La electroforesis se llevó a cabo en un sistema Mini-PROTEAN® 3 Cell (Bio-Rad Lab., Richmond, CA, USA). Los distintos reactivos fueron suministrados por Bio-Rad lab (Richmond, CA, Estados Unidos).

Como geles separadores se emplearon geles con un gradiente lineal de poliacrilamida del 9 al 18% en tampón Tris-HCl 0.375M y pH8.8, conteniendo SDS al 0.1% (p/v), persulfato amónico al 0.05% (p/v) y TEMED al 0.5% (p/v). Los geles fueron elaborados con el sistema Bio-Rad Gradient Former, modelo 395 (Bio-Rad Lab., Richmond, CA, USA).

Las electroforesis se realizaron a un voltaje constante de 200 V durante 1 hora, tras la cual los geles bien se tiñeron con Coomassie®

---

<sup>189</sup> **Laemmli UK.** Cleavage structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sup>4</sup> *Nature*. 1970; 227: 680.



Brilliant Blue G- 250 o bien fueron utilizados directamente para la transferencia a membranas de PVDF.

#### 2.4.2 Electroforesis bidimensional convencional (2D-IEF/SDS-PAGE).

La solubilización de 125 µg de vesículas de membrana se realizó en la llamada “solución con surfactantes múltiples”, conteniendo urea 5M, Tiourea 2M, TBP 2mM, CHAPS 2%, SB 3-10 (N-decil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propano-sulfonato) al 2%, anfolitos 3-10 al 0.2%, Tris 40 mM y azul de bromofenol al 0.0002%. El volumen total de la muestra ajustado a 125 µl se utilizó para rehidratar tiras de gradiente de pH inmovilizado (IPG) (Ready strip 7 cm Strips pH 3-10, Bio-Rad Lab., Richmond, CA, USA).

El isoelectroenfoque se llevó a cabo en una célula Protean IEF (Bio-Rad Lab., Richmond, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Todos los reactivos utilizados fueron suministrados por Bio-Rad Lab., Richmond, CA, USA. Tras la rehidratación durante 16h a 50 V y 20° C, se llevó a cabo el isoelectroenfoque (IEF) utilizando un programa que consta de cuatro pasos:

- S1 aumento de voltaje linear de 0 a 500 V durante 20 min.
- S2 aumento de voltaje linear de 500 a 4000 V durante 4h
- S3 aumento de voltaje lenta desde 4000 V durante 10000 V/h
- S4 o fase de mantenimiento: aumento de voltaje linear 500 V 16 - 18 h

De modo previo a la segunda dimensión, se procedió al equilibrado de la muestra utilizando el método propuesto por Görg *et al.*<sup>190</sup>, en el

---

<sup>190</sup> **Gorg A, Postel W, Domscheit A, Gunther S.** Two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients of leaf proteins from barley (*Hordeum vulgare*): method, reproducibility and genetic aspects. *Electrophoresis*. 1988; 9:681–692.

que las tiras IPG se equilibran en primer lugar, con un tampón que contiene urea 6 M, SDS al 2%, tampón Tris/ HCl 0.05M, pH 8.8, glicerol al 20% y DTT al 2%. La incubación se realizó a temperatura ambiente durante 15min, tras lo que se procedió al lavado de las tiras con agua desionizada. La segunda incubación se realizó con un tampón que contiene urea 6 M, SDS al 2%, tampón Tris/ HCl 0.05M pH 8.8, glicerol al 20% y iodacetamida al 2.5% durante otros 15 min. a temperatura ambiente. Tras un segundo lavado con agua desionizada, las tiras se equilibraron en tampón de electroforesis (SDS 3.47 mM, Tris 24.77 mM, glicina 58,61 mM) durante 10 segundos.

La segunda dimensión se realizó mediante electroforesis en SDS-PAGE utilizando geles en gradiente lineal de poliacrilamida con concentraciones entre el 9-18% (p/v). Las tiras IPG procedentes de la primera dimensión (IEF) se colocaron directamente sobre los geles concentradores de la segunda dimensión, rellenando el espacio sobrante con agarosa fundida tibia [Bio-Rad ReadyPrep™ Overlay Agarose 0.5% en TBS con azul de bromofenol (Bio-Rad Lab., Richmond, CA, USA)]. La electroforesis se realizó a 200 V durante 1 hora, tras la cual los geles bien se tiñeron con Coomassie® Brilliant Blue G- 250 o bien fueron utilizados directamente para la transferencia a membranas de PVDF.

### *2.5 Electrotransferencia a membranas de PVDF.*

Las proteínas previamente sometidas a SDS-PAGE se electrotransfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) Immobilon™ con un tamaño de poro de 0.45 µm (Millipore Corporation, Bedford, MA, Estados Unidos) mediante el sistema de electrotransferencia Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell

(Bio-Rad laboratories, Richmond, CA, Estados Unidos) tal y como indica el fabricante:

- Se cortaron dos piezas de papel Whatman y una membrana de PVDF, cada una de ellas del mismo tamaño que el gel a transferir.
- El papel Whatman y las almohadillas de fibra se equilibraron en tampón de transferencia (Tris 48 mM, glicina 39 mM, 20% (v/v) de metanol, pH 9.2) durante al menos 15 minutos.
- La membrana de PVDF se equilibró sumergiéndola en metanol 15 segundos, 2 minutos en agua destilada y al menos 10 minutos en tampón de transferencia.
- Los diferentes componentes se colocaron a modo de “sándwich” en el siguiente orden: una almohadilla de fibra, una lámina de papel Whatman, el gel de poliacrilamida y otra almohadilla de fibra.
- La transferencia de las proteínas a la membrana se realizó aplicando una corriente constante de 350 mA durante 1 hora.

## 2.6 Inmunodetección.

Una vez realizada la electrotransferencia, la membrana se bloqueó utilizando TBS con Blotto al 5% (p/v), agitación continua durante 2 horas a temperatura ambiente y se lavó tres veces con TBS-Tween. Tras el lavado la membrana se incubó con diferentes diluciones de sueros de ratón o conejo (**tabla 4**) en TBS-Tween con Blotto al 1% (p/v) durante aproximadamente 16 horas a 37° C con agitación. Tras lavar tres veces con TBS-Tween, la membrana se incubó durante 90 minutos a 37° C y agitación con anticuerpos de cabra anti-Igs totales de ratón o anti-IgG de conejo conjugados con peroxidasa y con avidina peroxidasa diluidos 1:1000 en TBS-Tween con Blotto al 1% (p/v). La membrana se lavó de nuevo tres veces y se reveló con PBS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/4-cloro-1-naftol durante 20 minutos a temperatura ambiente, deteniéndose finalmente la reacción

con agua desionizada. En algunos casos se realizaron detecciones secuenciales utilizando distintos sueros.

**Tabla 4:** Dilución de los sueros utilizados.

Suero	Origen	Concentración
$\alpha$ -RmpM	ratón	1:500
$\alpha$ -PorA	ratón	1:500
$\alpha$ -Nm30	ratón	1:1000
$\alpha$ -M982	ratón	1:1000
$\alpha$ -P47	conejo	1:500

El suero anti-PorA empleado (9-1-P1.c) reconoce un epitopo conformacional, por lo que es necesario renaturalizar las proteínas una vez transferidas a la membrana, para lo que se utilizó Empigen BB al 0.25%

*2.7 Análisis informático de los datos.*

Los geles y membranas se escanearon utilizando el Bio-Rad GS 800 Calibrated Densimeter (Bio-Rad laboratories, Richmond, CA, Estados Unidos). Para el análisis de las imágenes se utilizó el programa PDQuest versión 7.4.0 de Bio-Rad, con cuyas herramientas se identificaron y enumeraron los puntos correspondientes a las proteínas. Las calidad de las imágenes se mejoró mediante el uso de un filtro que aplica un algoritmo de reducción de ruido de media ponderada (matriz de 3x3 píxeles). Se detectaron los puntos correspondientes a las proteínas y se crearon curvas gaussianas para cada uno de ellos. Los mapas proteómicos e inmunoproteómicos de referencia para cada cepa se obtuvieron utilizando al menos tres mapas de OMVs obtenidas en días diferentes. El análisis comparativo de los datos se llevó a cabo utilizando el método más restrictivo de los proporcionados por el programa. El pI y el Pm de

las proteínas se aproximaron utilizando los estándares para SDS-PAGE de Bio-Rad, así como una serie de proteínas antigénicas de Pm y pI conocidos.

## 2.8 Identificación de proteínas por MALDI-TOF.

Algunas de las proteínas fueron identificadas mediante análisis por MALDI-TOF de los puntos más relevantes (aquellos claramente visibles y comunes a todas las cepas analizadas), que se cortaron manualmente de los geles bidimensionales teñidos con Coomassie Brilliant Blue y fueron sometidos a digestión trípica para obtener su huella peptídica mediante espectrometría de masas tipo MALDI-TOF utilizando un espectrómetro de masas con fuente de ionización MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*) y analizador tipo tiempo de vuelo (TOF), modelo *Voyager DE-STR Biospectrometry Workstation* con un *Voyager 2 GHz Acquisition System* (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos) o bien un *Bruker Reflex IV* (Bruker-Franzen Analytic GmbH, Bremen, Alemania) equipado con analizador reflectron, extracción retardada de iones y software *AutoXecute* para la adquisición automatizada de espectros. Las secuencias resultantes se compararon con las contenidas en las bases de datos utilizando el programa informático *Mascot*.<sup>191</sup> Para la interpretación final de los resultados obtenidos en las búsquedas en las bases de datos, el programa utilizó el algoritmo *MOWSE*, en base a la cantidad y abundancia relativa de los péptidos identificados, obteniéndose la probabilidad asociada a cada una de las proteínas identificadas (*MOWSE Score*).

---

<sup>191</sup> Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*. 1999; 20: 3551–3567.



### 3. Resultados.

#### 3.1 *Electroforesis bidimensional en IEF/SDS-PAGE. Identificación por MALDI-TOF.*

Con el fin de obtener mapas de referencia de proteínas de membrana externa de *N. meningitidis* y *N. lactamica*, OMVs de ambas especies fueron tratadas utilizando un protocolo que incluye condiciones de solubilización restrictivas y análisis bidimensional convencional (IEF/SDS-PAGE)

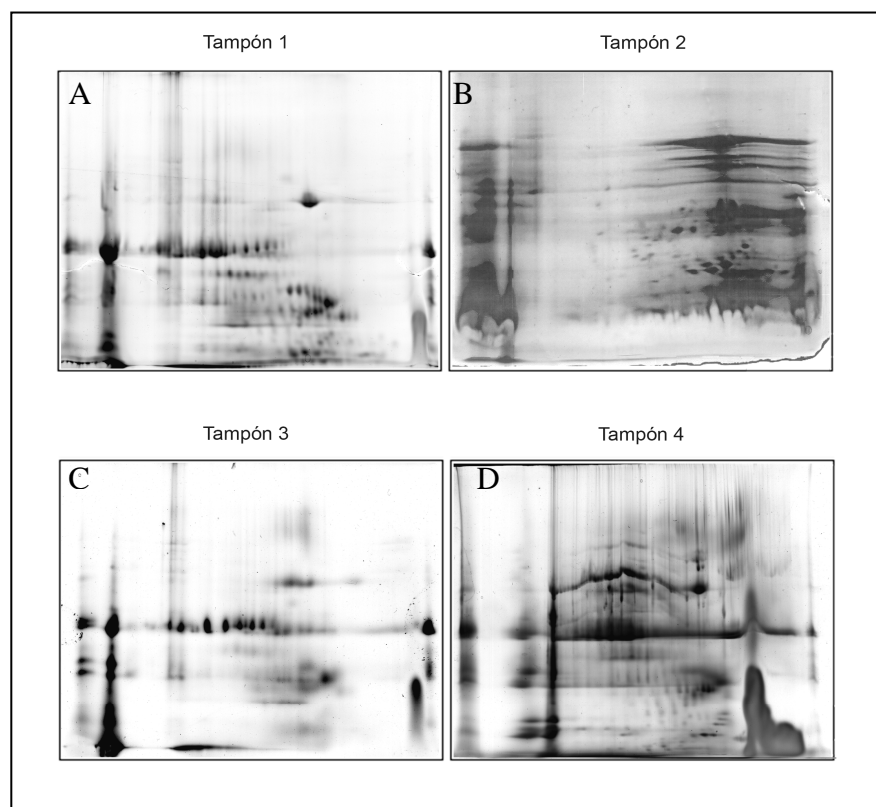
##### 3.1.1 Determinación de las condiciones óptimas de tiempo de IEF, solubilización y gradiente de pI.

Debido a los conocidos problemas que existen para la solubilización de proteínas de membrana, se probaron varios tampones conteniendo distintas concentraciones de urea y tiourea, con o sin Tris y con los detergentes SB 3-10, CHAPS o ASB-14 (**tabla 5**). Al evaluar la solubilización de las proteínas obtenida por los distintos métodos (**figura 1**) se observa que los mejores resultados se obtienen utilizando como agentes caotrópicos urea y tiourea (5M y 2M), una mezcla de CHAPS al 2% y SB 3-10 al 2% como detergentes y Tris a una concentración 40mM (**figura 1 A**). También se compararon distintos tipos de rehidratación, activa (50V, 16h a 20°C) y pasiva (16h a temperatura ambiente), observándose que al utilizar el segundo de los métodos disminuye tanto la cantidad de puntos detectados como su concentración, razón por la cual se utilizó la rehidratación activa (**figura 2**). En lo que respecta a las condiciones del IEF, la duración del segundo paso de la misma (aumento de voltaje linear de 500 a 4000 V) se varió para comprobar su influencia en el enfoque final. Se utilizaron tiempos de 3, 4 y 5h, observándose que con el más largo

se producían fallos de conductividad que llevaban a un mal enfoque de la muestra. Los resultados obtenidos con 3 y 4 h son muy similares, obteniéndose una buena resolución con ambos. Se eligió un tiempo de enfoque de 4h para ser utilizado en experimentos subsiguientes.

Utilizando IPG 3-10 se obtiene mejor resolución y focalización de proteínas que con IPG 4-7, además de permitir el análisis de la mayor parte de las proteínas presentes en la muestra en un solo gel.



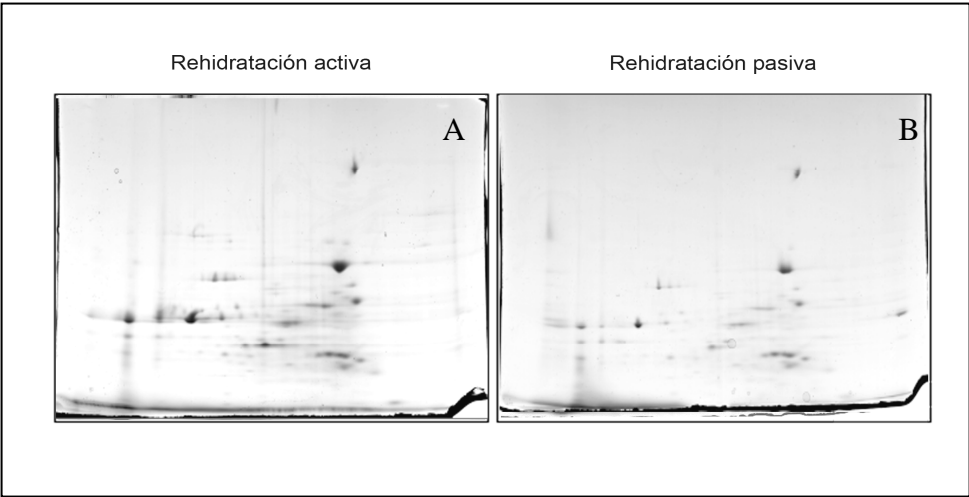


**Figura 1:** Comparación de las condiciones de solubilización de OMVs de *N. meningitidis*. Los geles resultantes de la electroforesis bidimensional IEF/SDS-PAGE utilizando cuatro tampones de rehidratación diferentes se tiñeron con coomassie. En el gel 1 (A), la muestra se rehidrató con el tampón número 1<sup>\*</sup>; en el gel 2 (B), con el tampón 2; en el gel 3 (C) con el tampón número 3 y en el gel 4 (D) con el tampón número 4. La formulación concreta de cada uno de los tampones se presenta en la tabla 5. La primera dimensión se llevó a cabo utilizando tiras IPG pH 4-7 en el gel 2 y pH 3-10 en las demás. La segunda dimensión se realizó en geles de poliacrilamida en gradiente del 7.5 al 15%.

<sup>\*</sup>Tampones indicados en la **tabla 5**.

**Tabla 5:** Composición detallada de los tampones de solubilización utilizados.

Tampón	Urea/ tiourea	Detergente	Agente reductor	Anfolito	Sal
1	5M /2M	2% SB 3-10 2% CHAPS	2mM TBP	0.2%	40mM Tris
2	8M	4% CHAPS	2mM TBP	0.2%	--
3	5M /2M	2% SB 3-10 2% CHAPS	2mM TBP	0.2%	--
4	7M / 2M	ASB14	2mM TBP	0.5%	40mM Tris



**Figura 2:** Comparación de las condiciones de rehidratación de las tiras IPG. Los geles obtenidos tras la electroforesis bidimensional IEF/SDS-PAGE se tiñeron con coomassie. En el gel 1 (A), la rehidratación se llevó a cabo de forma activa (50V ,16h a 20°C); en el gel 2 (B) se utilizó rehidratación pasiva (16h a temperatura ambiente). El IEF se realizó en tiras IPG pH 3-10 y la segunda en geles de poliacrilamida en gradiente del 9 al 18%.

### 3.1.2 Análisis proteómico.

Una vez determinadas las condiciones óptimas de IEF, el análisis mostró ser altamente reproducible con todas las cepas estudiadas. El programa informático de reconocimiento (PDQuest v. 7.4) detectó una cantidad de puntos que varía entre los 42 de la cepa *N. lactamica* NIP5 y los 202 de la cepa de *N. meningitidis* 3043. En los mapas obtenidos (**Figuras 3 a 16**) puede observarse que las cepas de *N. lactamica* analizadas presentan como media una cantidad de puntos menor que las de *N. meningitidis* (**Tabla 6**).

**Tabla 6:** Número de puntos detectados en mapas bidimensionales de distintas cepas de *N. meningitidis* y *N. lactamica*

	Cepa	Nº Puntos
<i>N. meningitidis</i>	B16B6	73
	Nm30	98
	M982	103
	2851	187
	3050 (2851 PorA <sup>-</sup> )	155
	3103 (2851 PorB <sup>-</sup> )	179
	2851 RmpM-	166
	3043 (2851 FetA <sup>-</sup> )	202
	3059	125
	3091 (3059 PorA <sup>-</sup> )	83
	3094 (3059 PorB <sup>-</sup> )	141
<i>N. lactamica</i>	NIP0	66
	NIP2	87
	NIP5	42

Para la comparación de los mapas obtenidos se utilizó como criterio el porcentaje de puntos coincidentes entre las distintas cepas. Los porcentajes de coincidencia varían en función de la imagen utilizada como modelo de referencia de los puntos establecidos como comunes y el tipo de ajuste utilizado, siendo preferible la utilización del gel con mayor cantidad de puntos como patrón de referencia (master). En nuestro caso, hemos utilizado para este propósito el gel correspondiente a la cepa 2851, pues es la cepa no mutante en la que se detectan más puntos. Una vez determinado el master y los puntos comunes, el programa de identificación de puntos realiza un emparejamiento automático en dos pasos.

En las **figuras 3 a 13** se presentan los mapas de referencia obtenidos tras el análisis de las distintas cepas de *N. meningitidis*. Las **figuras 3 a 7** corresponden a la cepa de referencia 2851 y a sus mutantes “knock-out” y las **figuras 8 a 10** a la cepa 3059 y sus mutantes. Las tres figuras restantes (**figuras 11 a 13**) corresponden a otras tres cepas de referencia (B16B6, Nm30 y M982). Se observa que la cantidad de puntos detectados en los diferentes mutantes de una misma cepa es similar y el grado de similitud entre ellas oscila entre el 35 y el 62% en los mutantes de la cepa 2851 y entre el 27 y el 52% en los de la cepa 3059 (**tabla 7**). Cabe destacar que en ambos casos el mutante con menor número de puntos comunes es el que carece de la proteína PorA.

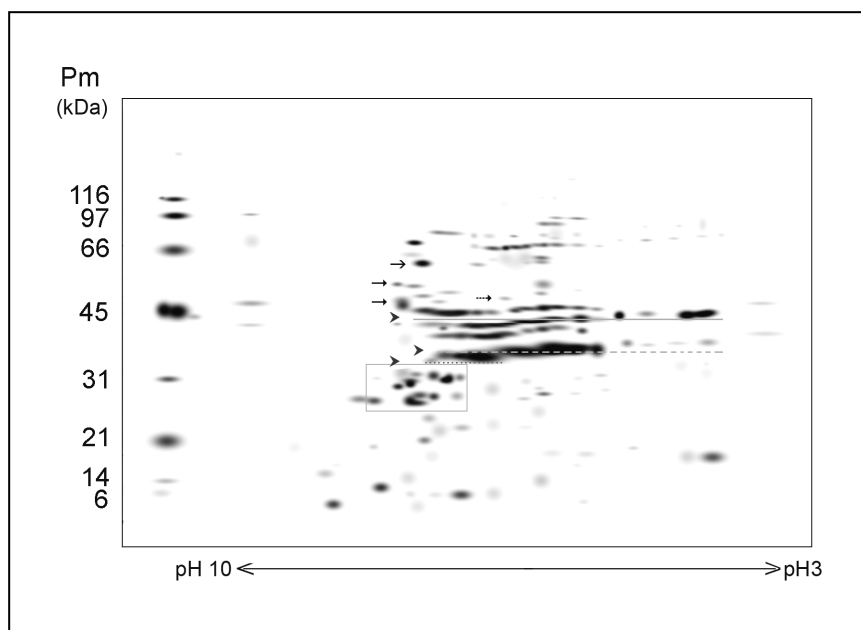
**Tabla 7:** Porcentaje de puntos coincidentes entre las cepas mutantes de *N. meningitidis* y la cepa salvaje correspondiente.

Cepas		Puntos detectados	Coincidentes con salvaje	Porcentaje de coincidencia
Salvaje	Mutante			
2851	—	187	—	100%
	3050 ( PorA-)	155	66	35%
	3103 (PorB-)	179	86	45%
	2851 RmpM-	166	108	57%
	3043 (FetA-)	202	117	62%
3059	—	125	—	100%
	3091 (PorA-)	83	34	27%
	3094 (PorB-)	141	64	52%

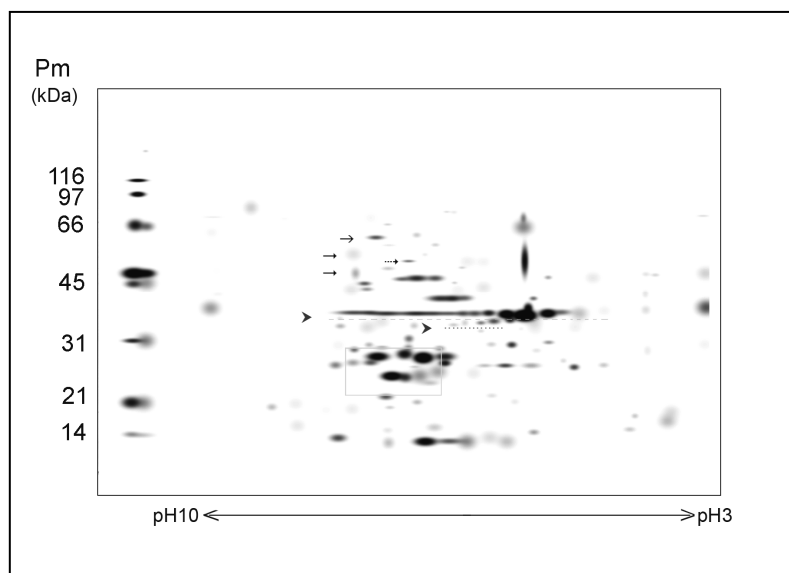
En el análisis de los geles correspondientes a las distintas cepas salvajes de *N. meningitidis* se observa que el porcentaje de puntos comunes se sitúa entre el 56% (B16B6 y 2851) y el 26% (B16B6 y 3059), siendo destacable la existencia de 11 puntos comunes a todas las cepas analizadas. Entre ellos se encuentran un punto de gran concentración situado en torno a 60 kDa y de *pI* 7 (→) y otros dos de 53.2 y 46.6 kDa con un *pI* ligeramente superior (→). El punto de Pm 49.2 kDa y *pI* 5 (→) también aparece en todas las muestras analizadas. Son característicos los puntos de Pm en torno a 30 kDa que se disponen formando un arco (recuadrado en las imágenes).

Como era de esperar algunos puntos únicamente están ausentes en las cepas mutantes carentes de una determinada proteína. Así, no se detecta la línea de puntos distribuidos a lo largo de todo el rango de *pI* correspondiente a una masa molecular de 42 kDa en las cepas mutantes 3050 y 3091 (**figuras 4 y 9**). Del mismo modo, tampoco es detectada la serie de puntos de 39 kDa en las cepas mutantes 3103 y 3094 (**figuras 5 y 10**). La línea tenue situada a la altura correspondiente a 36 kDa que es detectada en el mapa proteómico de

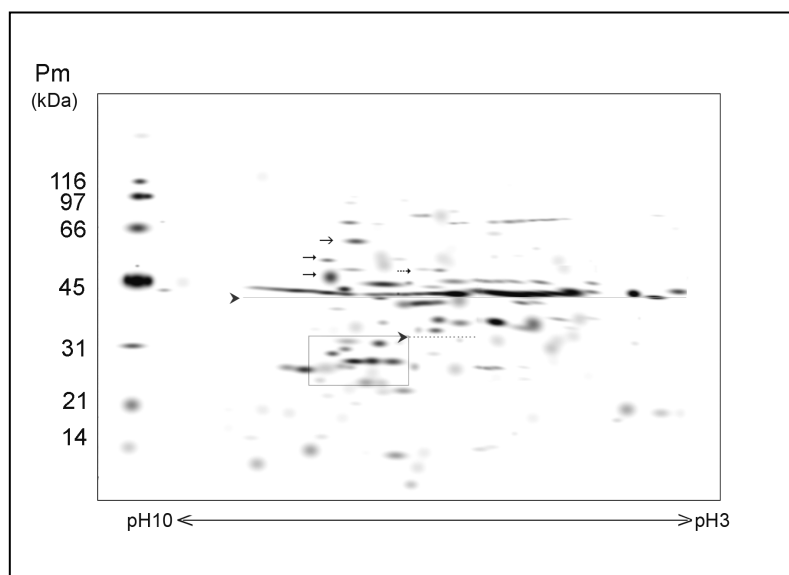
la cepa salvaje 2851 está ausente en la cepa mutante 2851 RmpM- (figura 7). Estos datos fueron utilizados para la identificación por comparación de estas proteínas.



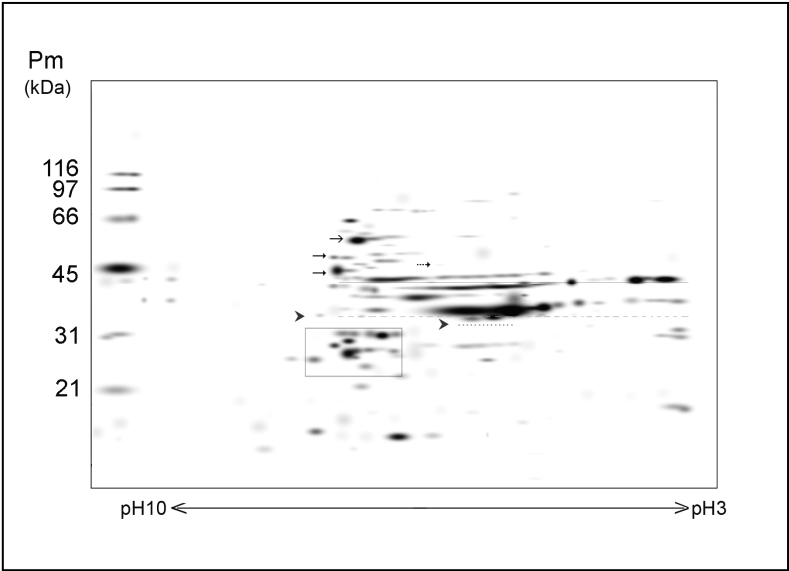
**Figura 3:** Electroforesis bidimensional en IEF/SDS-PAGE de OMVs de la cepa *N. meningitidis* 2851. Las líneas de puntos señaladas (>) se corresponden con las proteínas PorA (-), PorB (--) y RmpM (...).



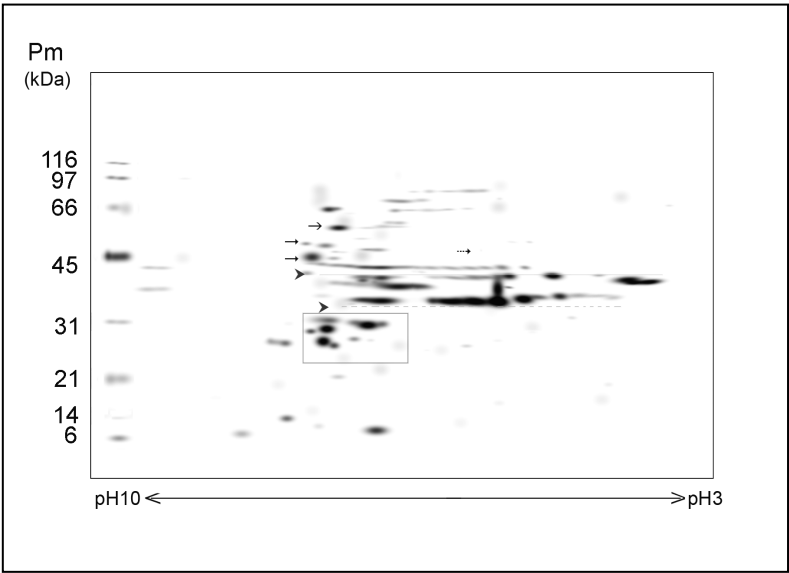
**Figura 4:** Electroforesis bidimensional en IEF/SDS-PAGE de OMVs de la cepa *N. meningitidis* 3050 (2851 porA-). Las líneas de puntos señaladas (➤) se corresponden con las proteínas PorB (--) y RmpM (...).



**Figura 5:** Electroforesis bidimensional en IEF/SDS-PAGE de OMVs de la cepa *N. meningitidis* 3103 (2851 PorB-). Las líneas de puntos señaladas (➤) se corresponden con las proteínas PorA (--) y RmpM (...).

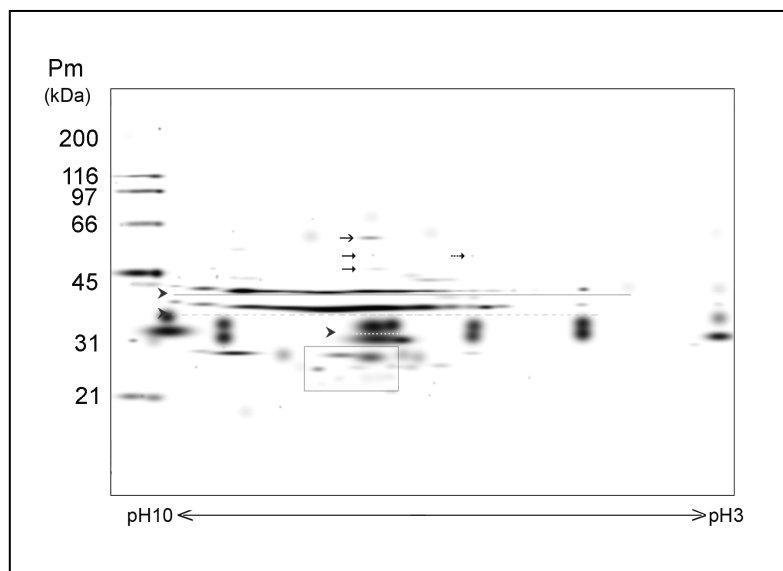


**Figura 6:** Electroforesis bidimensional en IEF/SDS-PAGE de OMVs de la cepa *N. meningitidis* 3043 (2851 FetA-). Las líneas de puntos señaladas se corresponden con las proteínas PorA (→), PorB (--) y RmpM (...).

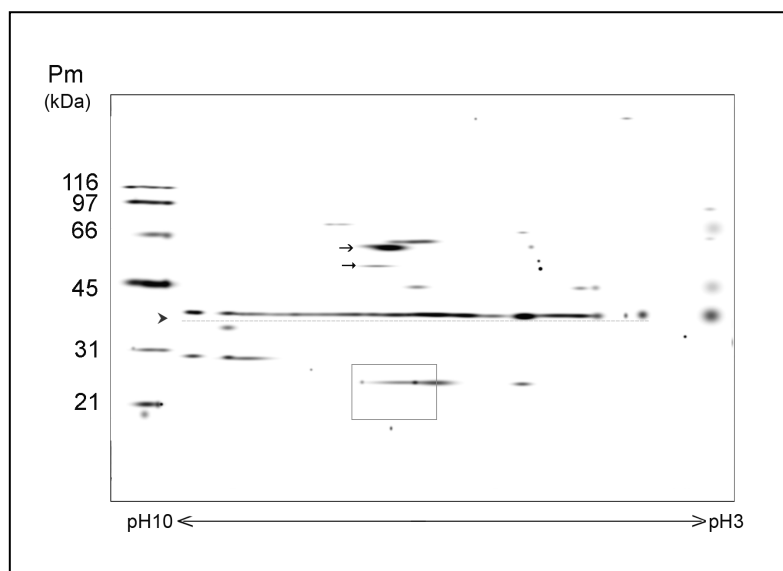


**Figura 7:** Electroforesis bidimensional en IEF/SDS-PAGE de OMVs de la cepa *N. meningitidis* 2851 RmpM-. Las líneas de puntos señaladas (→) se corresponden con las proteínas PorA (→) y, PorB (--).

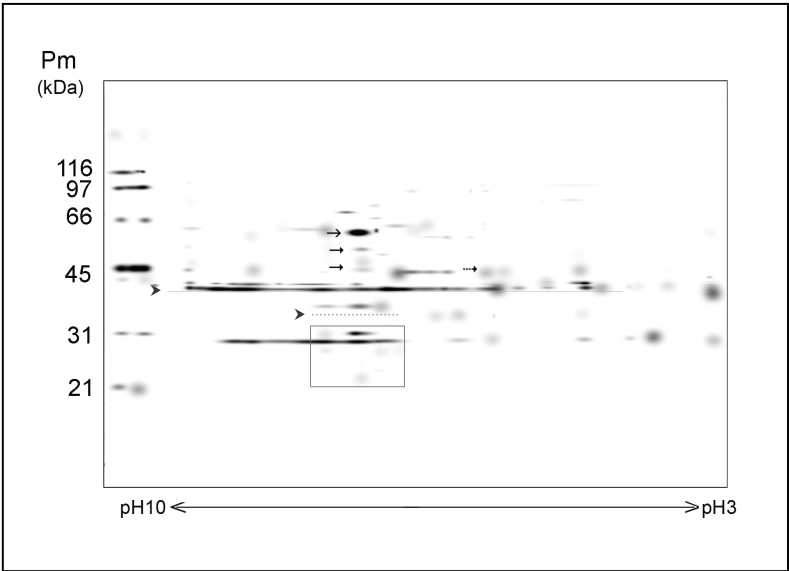




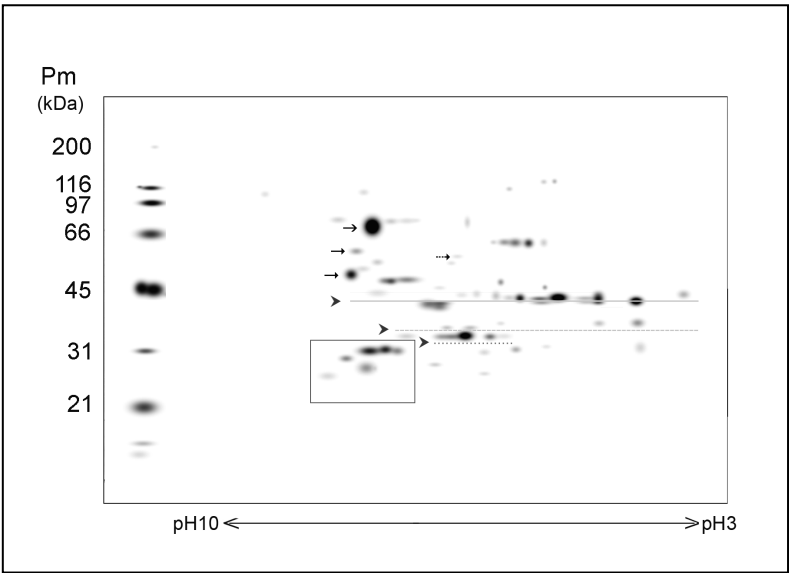
**Figura 8:** Electroforesis bidimensional en IEF/SDS-PAGE de OMVs de la cepa *N. meningitidis* 3059 (cepa salvaje). Las líneas de puntos señaladas (➤) se corresponden con las proteínas PorA (–), PorB (–) y RmpM (...).



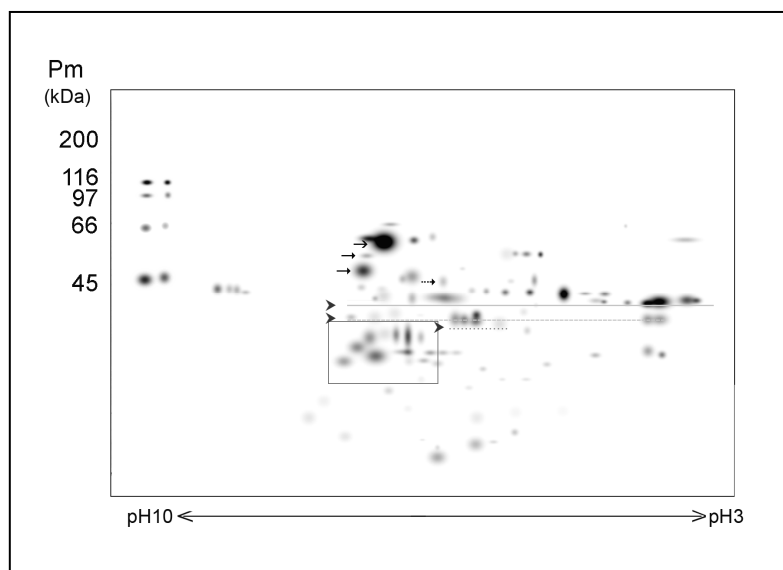
**Figura 9:** Electroforesis bidimensional en IEF/SDS-PAGE de OMVs de la cepa *N. meningitidis* 3091 (3059 PorA-). La línea de puntos señalada (➤) corresponde a la proteína PorB (–).



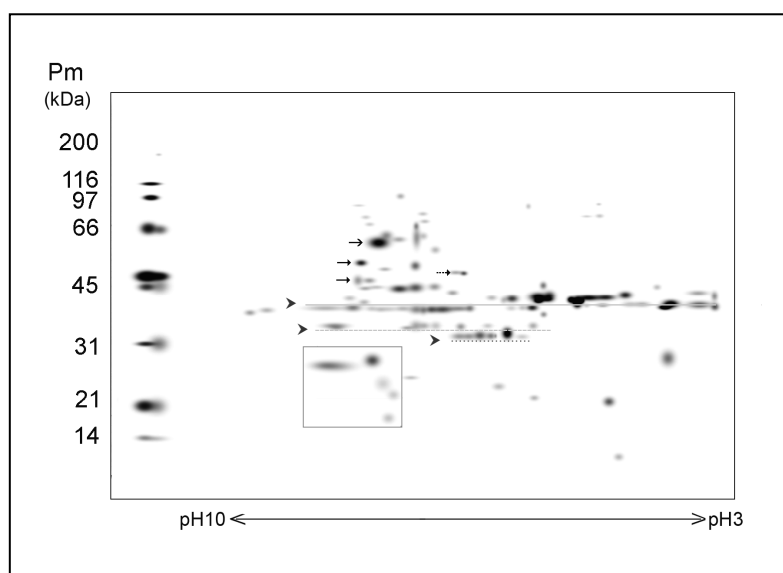
**Figura 10:** Electroforesis bidimensional en IEF/SDS-PAGE de OMVs de la cepa *N. meningitidis* 3094 (3059 PorB-). Las líneas de puntos señaladas (▶) se corresponden con las proteínas PorA (—) y RmpM (⋯).



**Figura 11:** Electroforesis bidimensional en IEF/SDS-PAGE de OMVs de la cepa *N. meningitidis* B16B6. Las líneas de puntos señaladas (▶) se corresponden con las proteínas PorA (—), PorB (--) y RmpM (⋯).

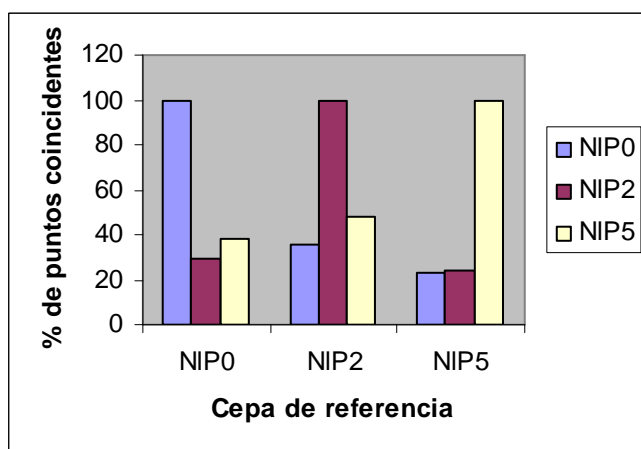


**Figura 12:** Electroforesis bidimensional en IEF/SDS-PAGE de OMVs de la cepa *N. meningitidis* Nm30. Las líneas de puntos señaladas (➤) se corresponden con las proteínas PorA (—), PorB (--) y RmpM (...).



**Figura 13:** Electroforesis bidimensional en IEF/SDS-PAGE de OMVs de la cepa *N. meningitidis* M982. Las líneas de puntos señaladas (➤) se corresponden con las proteínas PorA (—), PorB (--) y RmpM (...).

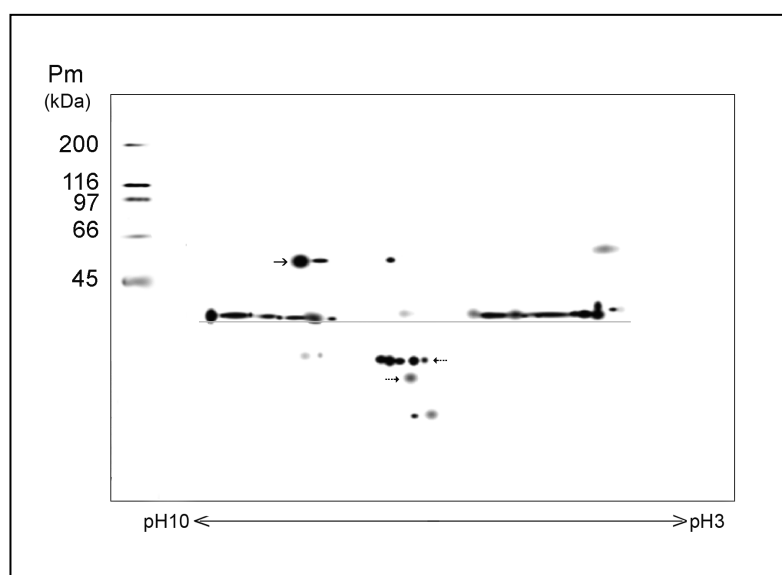
Las **figuras 14, 15 y 16** muestran los mapas proteómicos bidimensionales obtenidos con las OMVs de tres cepas de *N. lactamica*, NIP2, NIP0 y NIP5. Se procedió al análisis de los datos por triplicado, utilizando sucesivamente como gel de referencia (master) el mapa de cada una de las cepas analizadas. La similitud entre las distintas cepas de *N. lactamica* está recogida en la **gráfica 1**.



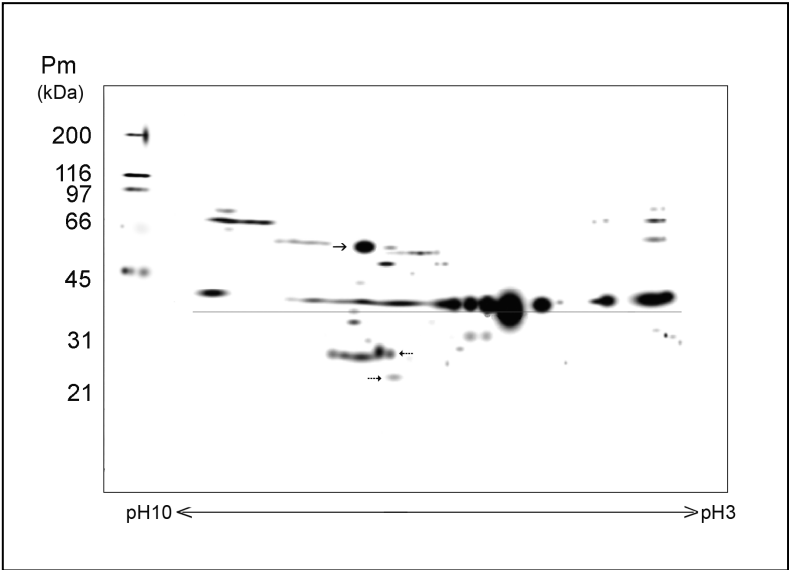
**Gráfica 1:** Porcentaje de puntos coincidentes en las cepas de *N. lactamica*, NIP0, NIP2 y NIP5. En el eje de abscisas se indica la cepa utilizada como master en cada caso.

En las cepas de *N. lactamica* se detectaron únicamente 17 puntos comunes a las tres cepas, que suponen el 40% de los presentes en NIP0, un 19% del total en NIP2 y un 25% en NIP5. La mayoría de estos puntos tienen un Pm similar, situándose entre 31 y 34 kDa, un pI comprendido entre 5 y 10 y se disponen formando una línea en los geles (—). Al igual que ocurría en el caso de *N. meningitidis*, hay un punto de 60 kDa y pI 7.5 que está presente en

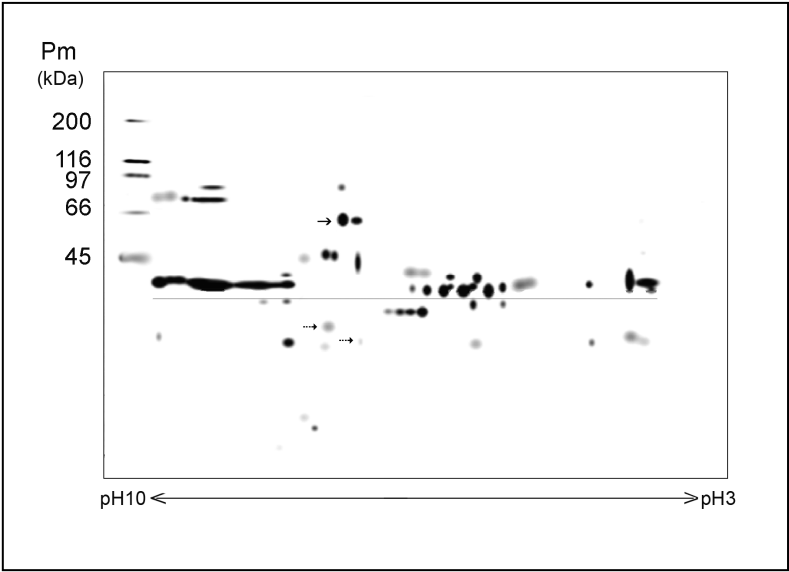
las tres cepas analizadas (→), además de otros dos puntos de Pm 17 y 20 kDa y pI 7 y 8 respectivamente que también aparecen en todas ellas (↔).



**Figura 14:** Electroforesis bidimensional en IEF/SDS-PAGE de OMVs de la cepa *N. lactamica* NIP0. La línea señalada se corresponde con la proteína PorB.

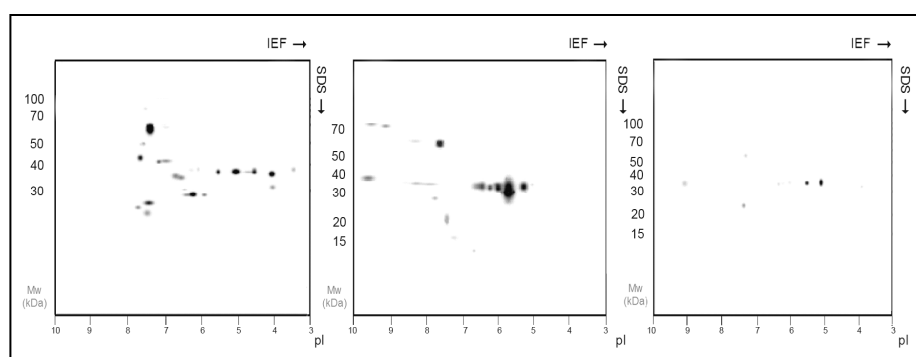


**Figura 15:** Electroforesis bidimensional en IEF/SDS-PAGE de OMVs de la cepa *N. lactamica* NIP2. La línea señalada se corresponde con la proteína PorB.



**Figura 16:** Electroforesis bidimensional en IEF/SDS-PAGE de OMVs de la cepa *N. lactamica* NIP5. La línea señalada se corresponde con la proteína PorB.

Partiendo de los datos recogidos para cada una de las cepas analizadas se elaboraron mapas de referencia para cada una de las especies (**figura 17**), que se compararon utilizando el “software” ya descrito, hallándose sólo una pequeña cantidad de puntos comunes en ambas especies (**figura 17 C**).

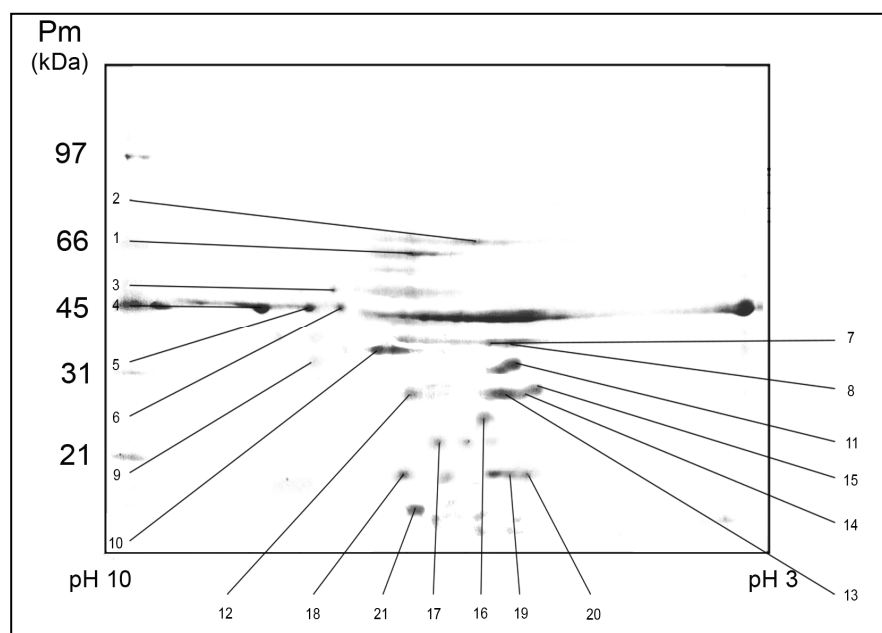


**Figura 17:** Puntos comunes a todas las cepas de (A) *N. meningitidis* (B) *N. lactamica* y (C) entre ambas especies.

### 3.1.3 Identificación por MALDI-TOF.

Algunas de las proteínas fueron identificadas mediante análisis por MALDI-TOF de los puntos más relevantes (aquellos claramente visibles y comunes a las distintas cepas). Para el análisis se utilizaron tres réplicas de los geles bidimensionales correspondientes a las cepas de *N. meningitidis* B16B6 (**figura 18**) y *N. lactamica* N1P2 (**figura 19**), obteniéndose los resultados que se presentan en las **tablas 8 y 9**. Se observa que la coincidencia entre ambas especies se limita a 5 proteínas, chaperonina de 60 kDa, proteína principal de unión a hierro,

RmpM, proteína periplasmática de unión a histidina y proteína de intercambio tiol:disulfuro DsbA, que se corresponden con 10 puntos en los mapas de *N. meningitidis* y 8 en los de *N. lactamica*.

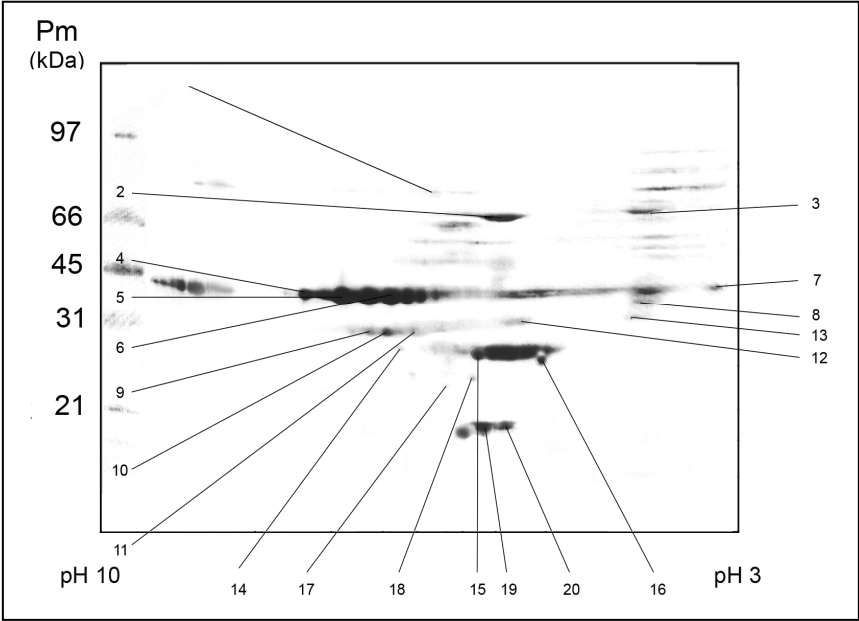


**Figura 18:** Proteínas identificadas por MALDI-TOF tras IEF/SDS-PAGE de OMVs de la cepa *N. meningitidis* B16B6. La identificación de los puntos más relevantes se llevó a cabo mediante análisis MALDI-TOF.



**Tabla 8:** Resultados obtenidos para la búsqueda en MASCOT tras el análisis de los puntos relevantes de la cepa *N. meningitidis* B16B6

Punto	Nº acceso GeneBank	Proteína	Pm		pI	
			Observado	Predicho	Observado	Predicho
1	CAA61894	OMP P64k o PM-6	61.0	62.2	6.6	5.4
2	P42385	Chaperonina de 60 kDa	66.4	57.5	6	5.0
3	CAB83479	Presunta proteína periplásmica	47.7	45.6	7.5	7.8
4	CAA40469	OMP de clase 1 (porA)	42.8	37.5	6.2	4.8
5	AAD52970	OMP de clase 1 (porA)	43.7	37.4	7.7	5.3
6	CAA40469	OMP de clase 1 (porA)	41.2	37.5	7.4	5.6
7	CAA46064	Proteína principal de unión a hierro	35.7	35.8	5.9	9.6
8	1904330A	Proteína de unión a hierro	31.6	33.5	5.7	9.5
9	A37004	OMP de clase 4 (RmpM)	31.2	26.2	7.7	6.5
10	A37004	OMP de clase 4 (RmpM)	33.7	26.2	7	6.5
11	CAB85320	OMP de clase 4 (RmpM)	33.5	26.3	5.9	7.0
12	CAB85353	proteína hipotética	27.5	27.3	6.7	5.6
13	CAB85420	Presunta proteína de intercambio tiol/disulfuro	27.3	25.4	5.9	5.8
14	CAB85036	Proteína periplásmica de unión a histidina	27.6	29.1	5.5	5.3
15	CAB85036	Proteína periplásmica de unión a histidina	29.0	29.1	5.4	5.3
16	AAF40732	Proteína de intercambio tiol/disulfuro DsbA	24.9	25.4	5.9	5.8
17	D81800	Posible peptidil-propil isomerasa NMA1756	22.8	28.9	5.5	5.7
18	AAF41888	Presunta peptidil-propil isomerasa	19.7	28.9	7	5.7
19	A81072	Precursor de la azurina	19.8	18.7	5.6	4.8
20	A81072	Precursor de la azurina	19.8	18.7	5.5	4.8
21	D81234	Factor de translocación - elongación Tu	16.9	43.1	6.7	5.1



**Figura 19:** Proteínas identificadas por MALDI-TOF en una electroforesis bidimensional en IEF/SDS-PAGE realizada con OMVs de la cepa *N. lactamica* NIP2.

**Tabla 9:** Resultados obtenidos para la búsqueda en MASCOT tras el análisis de los puntos relevantes de la cepa *N. lactamica* NIP2

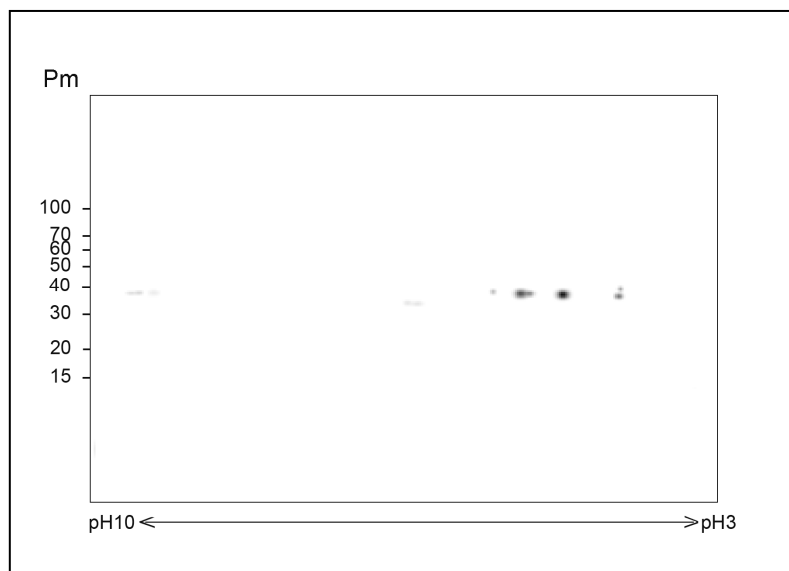
Punto	Nº acceso GeneBank	Proteína	Pm		pI	
			Observado	Predicho	Observado	Predicho
1	CAA61902	Proteína regulada por Hierro B ( <i>N.meningitidis</i> )	72.7	79.6	4.7	9.4
2	CAB83768	Subunidad de la chaperonina de 60kD	63.0	57.5	4.9	5.0
3	C81021	Subunidad de la chaperonina de 60kD NMB1972	66.1	57.5	4	5.0
4	CAA70491	Porina	36.2	31.6	7.2	7.2
5	CAA70491	Porina	35.6	31.6	7.7	7.2
6	CAA70491	Porina	36.2	31.6	7.1	7.2
7	CAA70491	Porina	37.7	31.6	3.4	7.2
8	CAA46071	Proteína periplásmica de unión a Hierro	29.9	34.2	4.1	9.5
9	A37004	Precursor de la OMP de clase 4	28.8	26.2	7.4	7.0
10	A37004	Precursor de la OMP de clase 4	28.8	26.2	7.2	7.0
11	A37004	Precursor de la OMP de clase 4	28.7	26.2	6.8	6.5
12	AAC44892	Proteína de utilización de Hemoglobina-haptoglobina A, hpuA ( <i>N.meningitidis</i> ).	29.7	36.6	5.8	8.7
13	CAB85036	Proteína periplásmica de union a histidina ( <i>N.meningitidis</i> )	30.1	29.0	4.2	6.0
14	AAK08056	Exl3L	29.7	47.0	7.1	4.5
15	AAW90622	Presunto transportador ABC, Proteína periplásmica de union a aminoácidos ( <i>N.gonorrhoeae</i> )	26.6	30.2	7.2	6.15
16	YP_209148	Antígeno derivado del genoma de <i>Neisseria</i> 1946 ( <i>N.gonorrhoeae</i> )	25.7	31.4	5.4	5.3
17	AAK08056	Exl3L.	23.7	47.0	4.5	4.5
18	AAF40732	Proteína de intercambio tiol/disulfuro DsbA	24.1	25.4	6.2	5.8
19	CAA29561	Producto proteico sin nombre ( <i>N.gonorrhoeae</i> )	20.3	18.7	6	4.7
20	AAF41888	OMP H.8 ( <i>N.meningitidis</i> )	20.3	18.7	5.8	4.7

#### 3.1.4 Análisis antigénico.

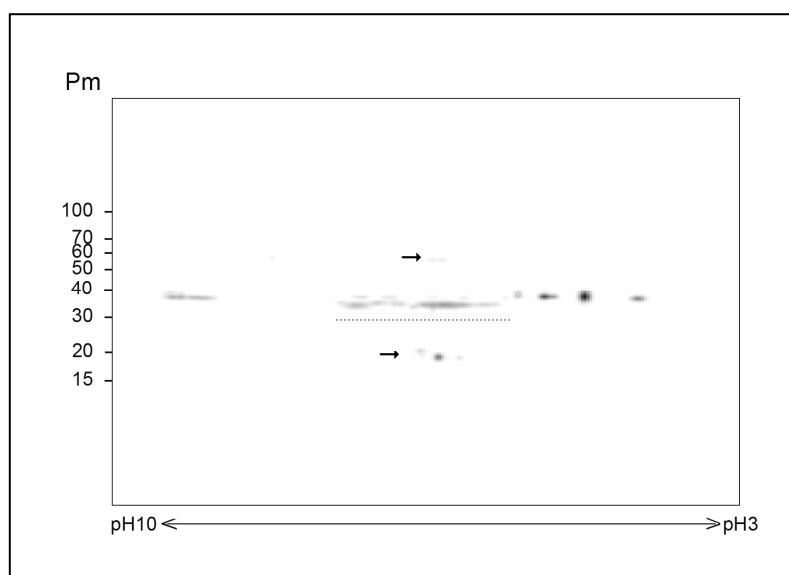
La disponibilidad de sueros anti-OMVs y sueros específicos anti-PorA, anti-RmpM y anti-P47 nos permitió realizar análisis antigénicos mediante Western-blotting en dos cepas de *N. meningitidis* (B16B6 y Nm30) y dos cepas de *N. lactamica* (NIP2 y NIP5). La identificación de estas proteínas antigénicas presentes en la membrana externa se realizó mediante una incubación secuencial utilizando los cuatro sueros en el siguiente orden:

- 1 - Suero monoclonal anti-PorA 9-1-P1.c
- 2 - Suero específico para la proteína de membrana RmpM mAb 185, H-8
- 3 - Suero específico contra la proteína de membrana P47 de Nm30
- 4 - Suero homólogo contra OMVs de cada una de las cepas estudiadas.

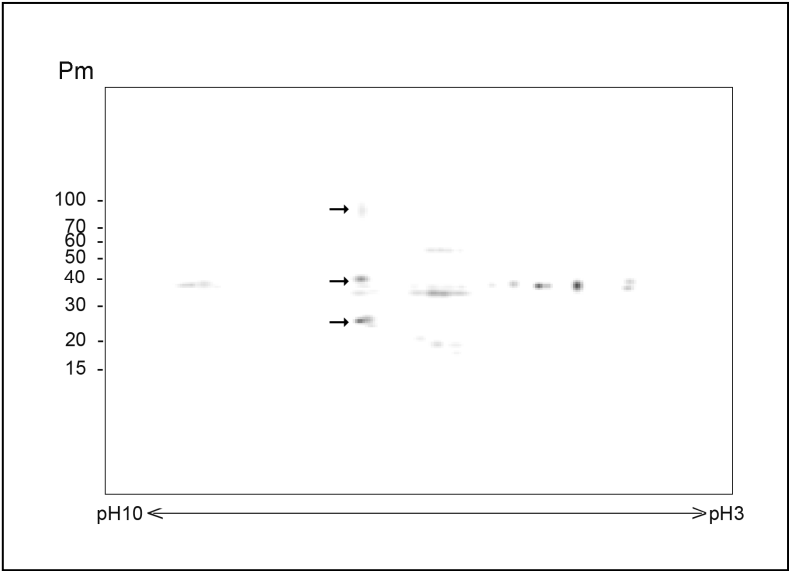
En el caso de la cepa B16B6, se obtuvieron los resultados que se muestran en las **Figuras 20 a 23** .



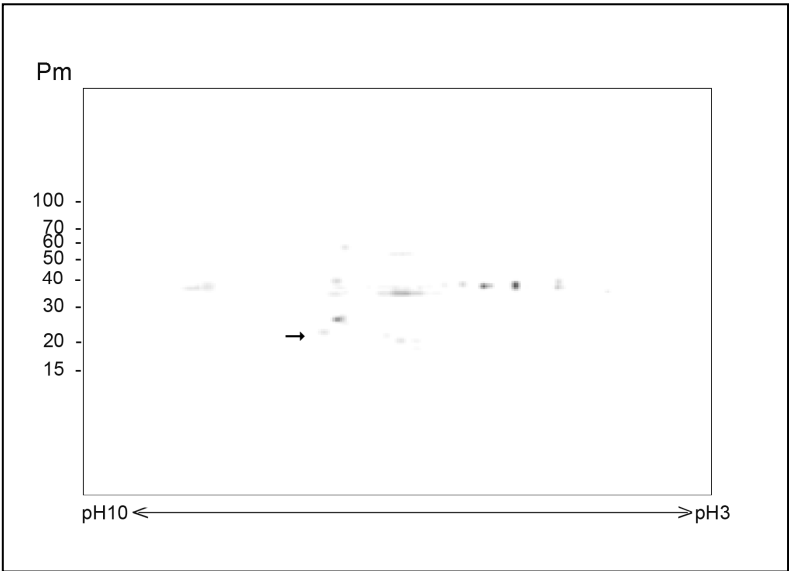
**Figura 20:** Western-blot de la cepa *N. meningitidis* B16B6 incubada con suero anti-PorA 9-1-P1.c



**Figura 21:** Western-blot de la cepa *N. meningitidis* B16B6 tras incubación secuencial con suero anti-PorA 9-1-P1.c y anti-RmpM. La línea discontinua y las flechas indican los puntos correspondientes a la proteína RmpM.



**Figura 22:** Western-blot de la cepa *N. meningitidis* B16B6 tras incubación secuencial con suero anti-PorA 9-1-P1.c, anti-RmpM y anti-P47. Los puntos correspondientes a la proteína P47 se indican con flechas.

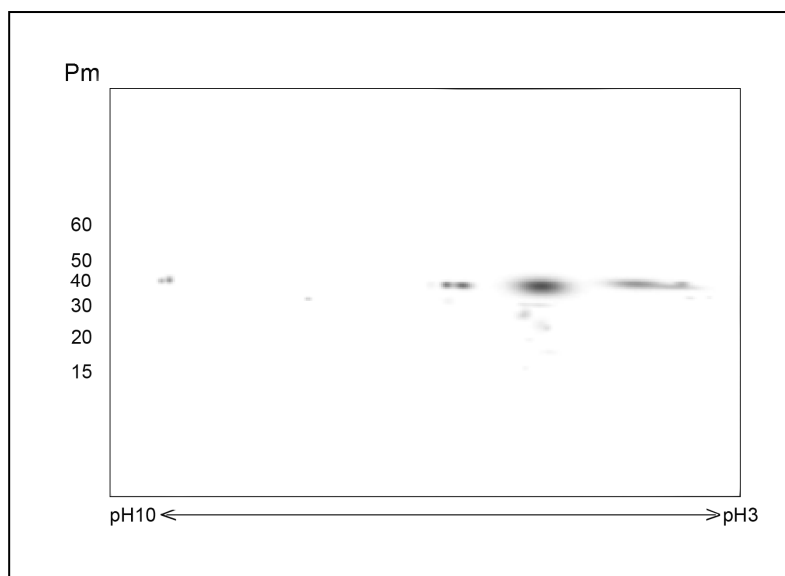


**Figura 23:** Western-blot de la cepa *N. meningitidis* B16B6 tras incubación secuencial con suero anti-PorA 9-1-P1.c, anti-RmpM, anti-P47 y anti-B16B6.

El suero monoclonal anti-PorA, con la cepa B16B6, reacciona con una serie de puntos de Pm similar (38-41 kDa) que difieren en su punto isoeléctrico. También se visualizan dos puntos con un Pm ligeramente inferior (32 kDa). El suero anti-RmpM permitió detectar la proteína modificable por reducción en torno a 35 kDa y distribuida en un rango de *pI* comprendido entre 7.4 y 5.6. En el caso de este suero cabe destacar la aparición, a *pI* 6 - 6.5, de otros puntos por encima y por debajo de los esperados: 3 en torno a 53.5 y 3 a 19 kDa. Estos puntos aparecen en las dos cepas de *N. meningitidis* analizadas, pero no en las de *N. lactamica*. Además, tampoco aparecen en los experimentos de electroforesis en una dimensión, de modo que su presencia podría deberse al tratamiento al que se someten las muestras. Tras la incubación con el suero anti-P47 aparecen 3 puntos, todos ellos de *pI* 7.2 y de Pm 56.2, 43.5 y 24.1 kDa respectivamente. En la incubación con suero homólogo anti-B16B6 sólo se aprecia otra proteína de Pm 20.6 kDa y *pI* 7.3 (→). La cantidad total de puntos detectados es 41, de los que sólo 19 (un 46%) coinciden con puntos presentes en los geles teñidos con Coomassie Brilliant Blue, lo cual se debe muy probablemente a la diferencia de sensibilidad de los métodos de detección utilizados, pues el Western-Blotting es capaz de detectar proteínas cuya concentración es insuficiente para ser identificadas por la tinción.

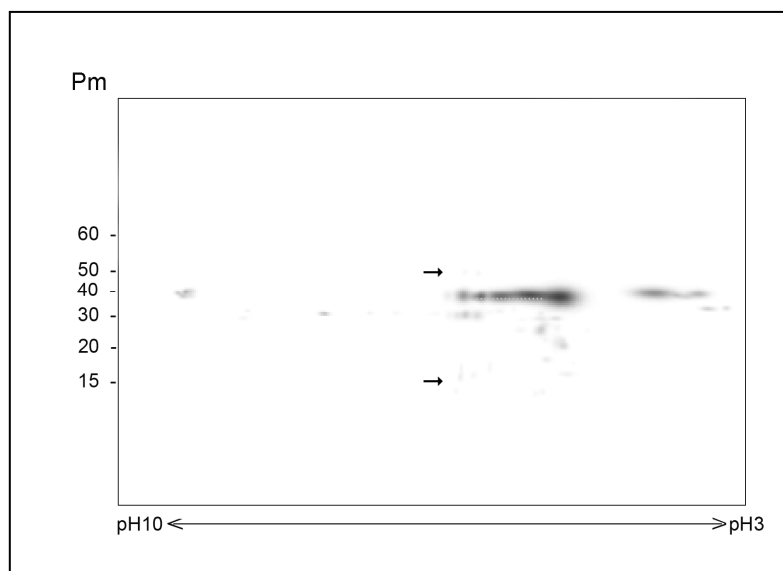
En el caso de la cepa Nm30, con el suero anti-PorA se detecta una línea de puntos de Pm en torno a 42 kDa cuyos *pI* abarcan valores comprendidos entre 3 y 10, concentrándose entre 6.6 y 9.8. Por debajo de esta línea, a *pI* 7.6 a 8 aparecen una serie de proteínas de menor Pm (26, 31 y 36 kDa respectivamente). Cuando se utiliza el suero anti-RmpM se obtiene un patrón muy similar al de la cepa B16B6, así las proteínas de 53.5 y 19 kDa también son detectadas. Al incubar con suero anti-Nm30 se

detectan 68 proteínas, de las que 32 (un 47%) coinciden con las presentes en el gel (**Figuras 24 a 26**).

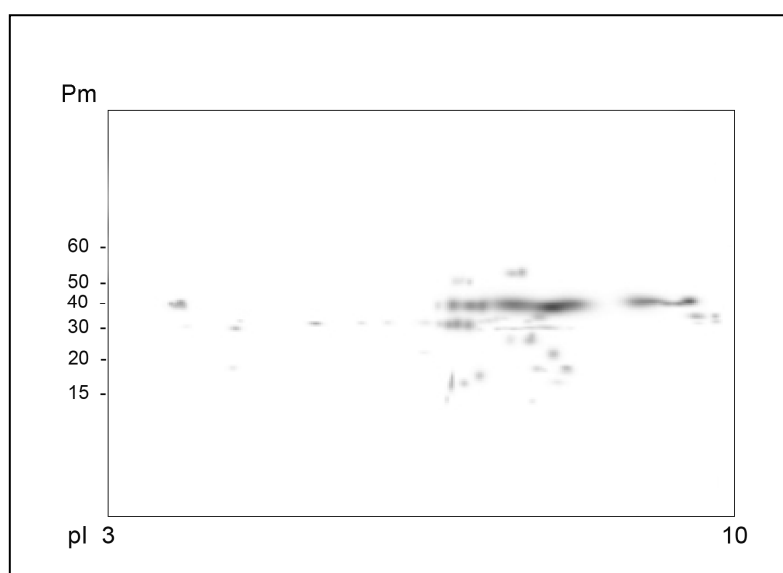


**Figura 24:** Western-blot de la cepa *N. meningitidis* Nm30 incubada con suero anti-PorA.





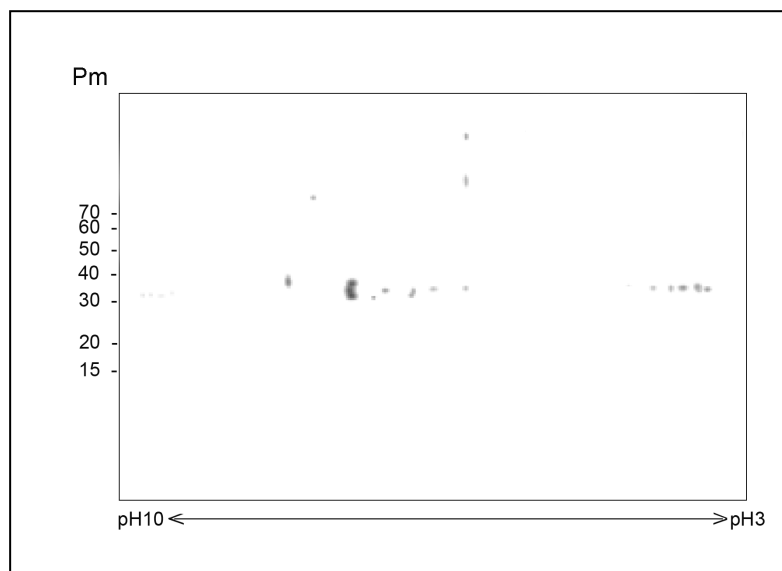
**Figura 25:** Western-blot de la cepa *N. meningitidis* Nm30 tras incubación secuencial con suero anti-PorA y anti-RmpM. La línea discontinua y las flechas indican los puntos correspondientes a la proteína RmpM.



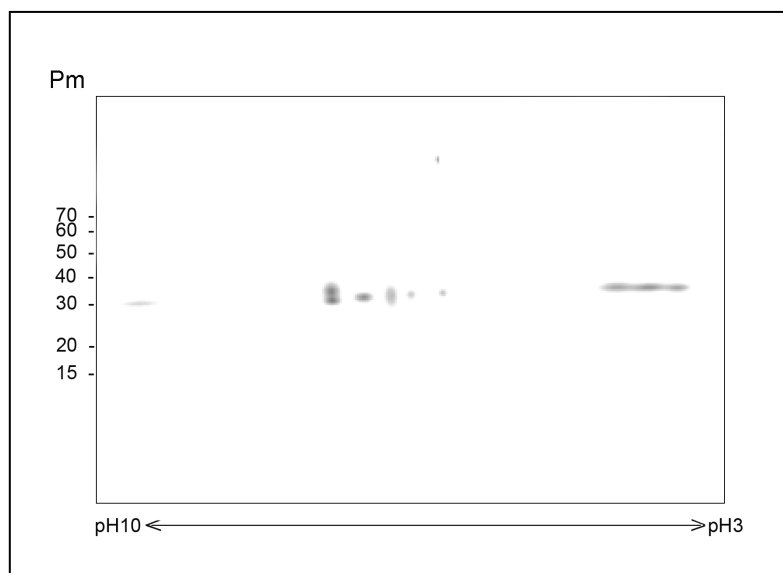
**Figura 26:** Western-blot de la cepa *N. meningitidis* Nm30 tras incubación secuencial con suero anti-PorA, anti-RmpM y anti-Nm30

Al realizar Western-blotting analizando los mismos sueros (a excepción del anti-PorA, pues *N. lactamica* carece de proteína de clase 1) con las cepas de *N. lactamica* NIP2 y NIP5, se obtuvieron los resultados que se presentan a continuación:

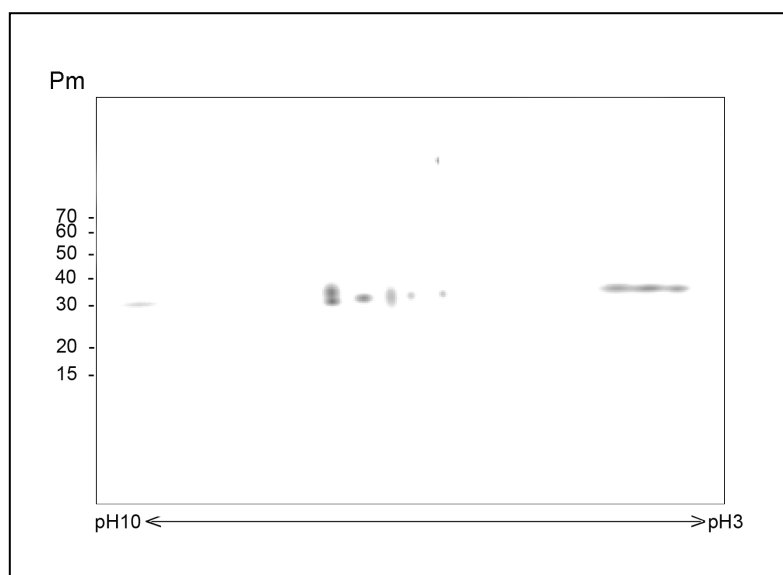
En la cepa NIP2 el suero anti-P47 no reacciona con ninguna proteína. La mayor parte de los puntos antigénicos se corresponderían con la RmpM (**Figuras 26, 27 28 y 29**), que en este caso se sitúan a un Pm ligeramente inferior que en *N. meningitidis* (32 – 34 kDa). Ni en esta cepa ni en la cepa NIP5 aparecen antígenos de mayor o menor Pm a *pI* 7.2, por lo que puede considerarse que éstas son exclusivas de *N. meningitidis*.



**Figura 27:** Western-blot de la cepa *N. lactamica* NIP2 incubada con suero anti-RmpM



**Figura 28:** Western-blot de la cepa *N. lactamica* NIP2 incubada secuencialmente con suero anti-RmpM y anti-P47



**Figura 29:** Western-blot de la cepa *N. lactamica* NIP2 incubada secuencialmente con suero anti-RmpM, anti-P47 y anti-NIP2

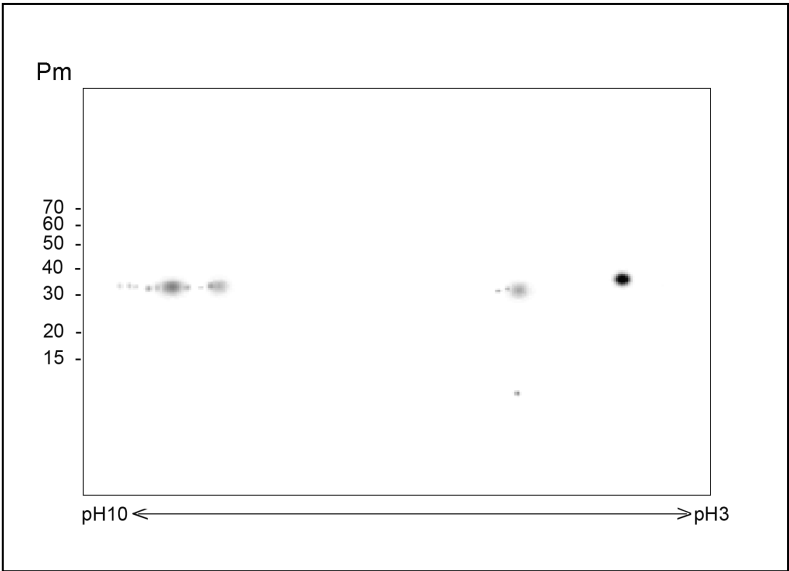


Figura 30: Western-blot de la cepa *N. lactamica* NIP5 incubada con suero anti-RmpM

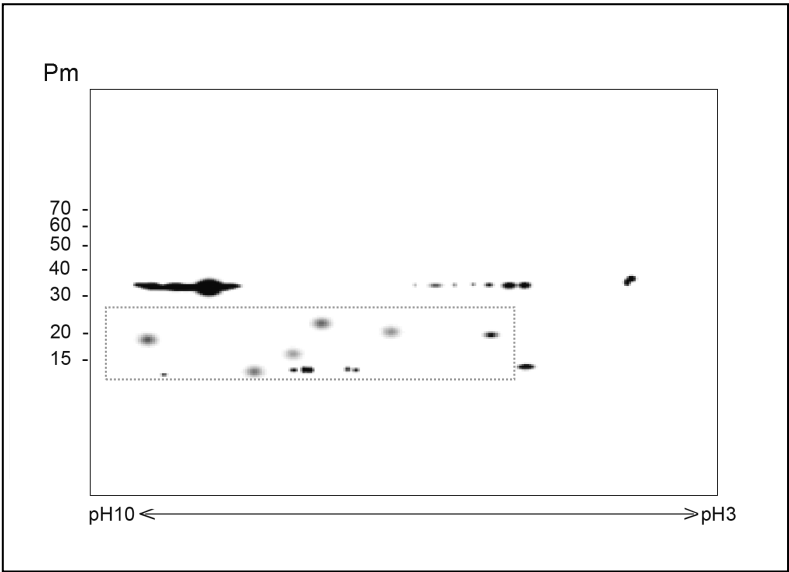
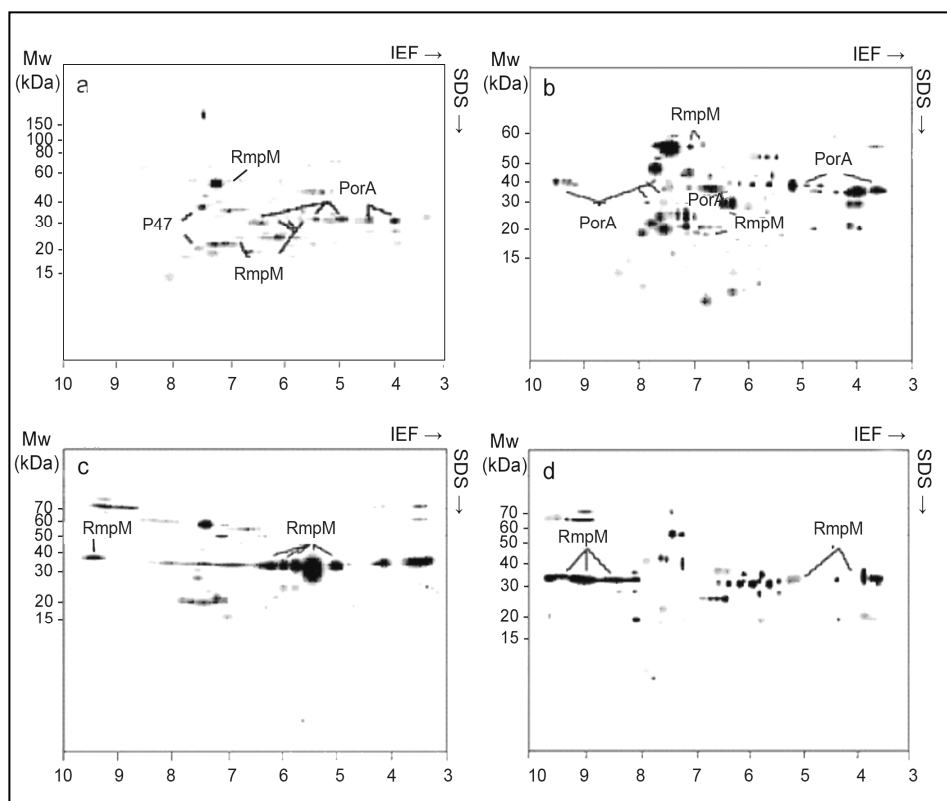


Figura 31: Western-blot de la cepa *N. lactamica* NIP5 incubada secuencialmente con suero anti-RmpM y anti-NIP5

En lo que respecta a la cepa NIP5, las reacciones son muy similares a las de la NIP2. Así, tampoco es posible detectar la proteína P47 (figura no mostrada) y los puntos correspondientes a la RmpM se encuentran en el mismo rango de *pI* y *Pm* (**Figura 30**). Cabe destacar la presencia de una serie de antígenos cuyo *Pm* es menor de 25 kDa que se revelan tras la incubación con suero anti-NIP5 (**Figura 31**).

En la **figura 32** se presentan los mapas inmunoproteómicos contruidos a partir de los datos obtenidos tras el análisis de cada una de las cuatro cepas mediante IEF/SDS-PAGE y posterior Western-blotting secuencial con los distintos anticuerpos monoclonales y sueros policlonales anti-OMVs y anti-P47. El anticuerpo monoclonal anti-PorA reacciona en las cepas de *N. meningitidis* con varios puntos de *Pm* comprendido entre 31 y 41 kDa y *pI* variable (**32A** y **32B**). Por su parte, el suero monoclonal anti-RmpM identifica puntos tanto en *N. meningitidis* como en *N. lactamica* con los *Pm* esperados en cada una de las especies (32-34 kDa en *N. lactamica*; 37 kDa en *N. meningitidis*). En *N. meningitidis* se detectan además puntos con un *Pm* que está por encima y por debajo de lo esperado, lo que sugiere la presencia de formas de RmpM comunes a ambas especies y de otras exclusivas de *N.meningitidis*, que tienen un *Pm* diferente del observado en base a 1D-SDS-PAGE: Tres de estas formas se localizan en torno a los 53 kDa y otras tres en torno a los 19kDa (17A, 17B). El suero anti-P47 detecta tres puntos presentes en todas las cepas de *N. meningitidis* analizadas, con un *pI* de 7.2 y *Pm* 27, 43 y 56 kDa, pero no reacciona en *N. lactamica* en las condiciones utilizadas para el ensayo.

Al comparar informáticamente los mapas inmunoproteómicos de las distintas cepas de ambas especies se encuentran 9 puntos comunes a todas ellas, 7 de los cuales corresponden a la proteína RmpM.



**Figura 32:** Mapas inmunoproteómicos de los antígenos de membrana externa de las cepas de *N. meningitidis* B16B6 (A) y Nm30 (B) y de las cepas de *N. lactamica* NIP2 (C) y NIP5 (D). Los puntos marcados en la figura fueron identificados mediante análisis secuencial con anticuerpos monoclonales contra las proteínas PorA, PorB y RmpM y con dos sueros policlonales contra la proteína P47 y contra OMVs completas.

#### 4. Discusión.

En el presente capítulo se describe el estudio del proteoma de membrana externa de cepas patógenas de *N. meningitidis* y de la especie comensal *N. lactamica* mediante el uso de electroforesis bidimensional IEF/SDS-PAGE y la identificación de las proteínas separadas por MALDI-TOF. A partir de los datos obtenidos se han construido mapas proteómicos e inmunoproteómicos de proteínas de membrana externa con el fin de identificar antígenos comunes a ambas especies o exclusivos de cada una de ellas. Del mismo modo, se ha estudiado el proteoma de membrana externa de una serie de mutantes “knock-out” de *N. meningitidis* con el fin de determinar la influencia de la ausencia de determinadas proteínas en los patrones obtenidos. Los datos obtenidos muestran que la construcción de mapas de referencia sólo es posible tras una separación adecuada de las proteínas presentes en las muestras.

La gran cantidad de trabajos realizados con anterioridad al comienzo de este estudio<sup>184,192,193</sup> mostraban que la electroforesis bidimensional basada en IEF y posterior SDS-PAGE proporcionaba una buena resolución en la separación de proteínas, siendo una técnica adecuada para la elaboración de mapas proteicos de referencia. Además, al utilizarla en combinación con Western-blotting con sueros específicos, posibilitaría la elaboración de mapas inmunoproteómicos, siendo en esas fechas la única técnica que permitía la detección y comparación de antígenos independientes. Teniendo en cuenta que algunas proteínas antigénicas de membrana no pueden ser analizadas de este modo debido a su *pI* extremo o a problemas de solubilización durante la

---

<sup>192</sup> Ferrari G, Garaguso I, Adu-Bobie J, Doro F, Taddei AR *et al.* Outer membrane vesicles from group B *Neisseria meningitidis*  $\Delta$ -gna33 mutant: Proteomic and immunological comparison with detergent-derived outer membrane vesicles. *Proteomics*. 2006; 6:1856–1866.

<sup>193</sup> Vipond C, Suker J, Jones CH, Tang C, Feavers IM *et al.* Proteomic analysis of a meningococcal outer membrane vesicle vaccine prepared from the group B strain NZ98/254. *Proteomics*. 2006; 6: 3400–3413.

separación por IEF en la primera dimensión, la determinación de las condiciones idóneas para el proceso (tipo y concentración de detergentes, gradiente de pH, presencia de agentes caotrópicos...) es crucial si se quiere lograr una separación adecuada.

En el presente estudio, las mejores condiciones de resolución y reproducibilidad se obtuvieron utilizando urea 5M y tiourea 2M durante la solubilización de las muestras. Otros factores importantes fueron la determinación de tiempos de incubación adecuados y el uso de detergentes zwitteriónicos para impedir el aumento de la carga iónica de la solución, lo que permite la aplicación de altos voltajes sin que haya un incremento importante en la intensidad de la corriente.

La dificultad para detectar proteínas minoritarias es otra de las limitaciones de este método, de tal modo que si se quiere trabajar con proteínas presentes en bajas concentraciones es necesario aumentar la carga, lo que puede provocar un enmascaramiento de los puntos adyacentes a las proteínas mayoritarias. Cuando el objetivo es detectar proteínas antigénicas, este problema se solventa mediante la utilización de anticuerpos específicos, que se unen con gran afinidad a determinadas proteínas provocando una amplificación aparente de su cantidad. Se observa que algunos de los puntos detectados tras el “inmunoblotting” no se corresponden con ninguno de los puntos visualizados con la tinción de Coomassie, por lo que muy probablemente se trate de proteínas minoritarias imperceptibles tras el uso de esta tinción.

El análisis mediante 2D IEF/SDS-PAGE e “inmunoblotting” confirma la presencia de la PorA en todas las cepas de *N. meningitidis* (a excepción de la mutante PorA-) y su ausencia en todas las de *N. lactamica*, hecho que ya había



sido establecido con anterioridad por Kim y col.<sup>194</sup> y Vaughan y col.<sup>182</sup> La observación en los mapas de *N. meningitidis* de la variabilidad tanto en Pm como en pI de la PorA concuerda con los estudios publicados por Uli y col.<sup>184</sup> y por Vipond y col.<sup>193</sup> sobre la composición de vacunas basadas en OMVs. Este tipo de distribución, como describen estos autores, puede deberse a modificaciones y/o procesamiento postranslacional o bien a la asociación de la PorA con diversos complejos de membrana de pI variable descritos anteriormente en nuestro laboratorio<sup>195</sup> que no son resueltos durante la etapa de IEF.

La presencia de puntos de distinto Pm detectados con el anticuerpo monoclonal anti-RmpM podría deberse al tratamiento al que son sometidas las muestras, aunque también cabe considerar que en el caso de las formas con un Pm de 19 kDa podrían estar implicadas en el proceso de dimerización de la RmpM, descrito recientemente por Grizot y col.<sup>196</sup> De hecho el Pm de este punto coincide con el del fragmento C-terminal de la proteína, llamado RmpM-Cter, consistente en un dominio tipo OmpA de 18 kDa capaz de interaccionar con otras proteínas de membrana externa. Los puntos de mayor Pm identificados por el anticuerpo utilizado en el presente estudio probablemente correspondan a diferentes conformaciones de la RmpM o a asociaciones de la misma con otros componentes de membrana (PorA y/o PorB), que afectarían a su movilidad electroforética.

---

<sup>194</sup> **Kim JJ, Mandrell RE, Griffiss JM.** *Neisseria lactamica* and *Neisseria meningitidis* share lipooligosaccharide epitopes but lack common capsular and class 1, 2, and 3 protein epitopes. *Infect Immun.* 1989; 57: 602–608.

<sup>195</sup> **Sánchez S, Arenas J, Abel A, Criado MT, Ferreirós CM.** Analysis of outer membrane protein complexes and heat-modifiable proteins in *Neisseria* strains using two-dimensional diagonal electrophoresis. *J Proteome Res.* 2005; 4: 91–95

<sup>196</sup> **Grizot S, Buchanan SK.** Structure of the OmpA-like domain of RmpM from *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol.* 2004; 51: 1027–1037.

El anticuerpo monoclonal anti-RmpM no detecta ninguno de estos puntos de mayor o menor Pm en ninguna de las cepas de *N. lactamica*, lo que sugiere que son formas específicas de *N. meningitidis*. En *N. lactamica*, la RmpM aparece como una serie de puntos de Pm comprendido entre 32 y 34 kDa, en concordancia con estudios previos realizados en nuestro laboratorio<sup>141</sup>. La ausencia de puntos antigénicos de mayor o menor Pm a en las cepas de la especie comensal analizadas podría explicar las diferencias en la movilidad electroforética de la proteína entre ambas especies.

En base al análisis informático de los resultados obtenidos de *N. meningitidis* y *N. lactamica*, nuestros resultados indican que cepas diferentes pueden tener proteomas diferentes a pesar de tener la misma composición proteica. Es más, una cepa de *N. meningitidis* y una de *N. lactamica* pueden tener un porcentaje de similaridad (basado en puntos coincidentes) comparable al que existe entre dos cepas de *N. meningitidis*. Además, se demuestra que no hay una correspondencia exacta entre inmunomas y proteomas, lo que dificulta la identificación de los antígenos específicos de una especie y de los compartidos por ambas especies. Cuando los puntos son analizados por MALDI-TOF queda claro que las movilidades observadas no son fiables y resultan inadecuadas para llevar a cabo comparaciones incluso entre cepas de la misma especie.

La evaluación y comparación de los mapas inmunoproteómicos mediante el uso de programas de análisis de imagen sólo permite identificar una proteína antigénica común a ambas especies, la RmpM. Sin embargo, el análisis visual de los resultados obtenidos tras la incubación con sueros policlonales revela la presencia de otras muchas proteínas comunes, si bien la carencia de anticuerpos monoclonales contra dichas proteínas no nos ha permitido establecer relaciones precisas entre puntos antigénicos. Es importante resaltar

que las proteínas comunes a las dos especies pueden mostrar diferencias en su  $P_m$ , como ocurre en el caso de la RmpM (32 a 35 kDa). Además, las proteínas con alto  $P_m$ , proteínas formadoras de complejos y aquellas altamente hidrofóbicas podrían no entrar en los geles o enfocarse mal durante la primera dimensión. De un modo similar, las proteínas con valores de  $pI$  extremos podrían quedar excluidas de los geles de IEF, lo que provocaría la aparición de patrones proteicos o antigénicos muy diferentes de los obtenidos tras 1D SDS-PAGE. Muchos antígenos parecen, por tanto, desaparecer o mostrar patrones anómalos. De modo similar hay que tener en cuenta que las condiciones de solubilización utilizadas en IEF son muy diferentes de las utilizadas en 1D SDS-PAGE, por lo que consideramos que el análisis adecuado de los inmunoproteomas de membrana bacteriana todavía requiere investigación en las técnicas de separación.

En lo que respecta a los resultados obtenidos al analizar cepas mutantes “knock-out”, la ausencia de los puntos correspondientes a las proteínas en las que cada una de ellas es defectiva permite su identificación por comparación con las cepas salvajes correspondientes.

La identificación de las proteínas comunes detectadas mediante digestión triptica, obtención de la huella peptídica y búsqueda en las bases de datos disponibles para *N. meningitidis* nos ha permitido la identificación de una serie de puntos relevantes, de los cuales sólo 5 coinciden en ambas especies, chaperonina de 60 kDa, proteína principal de unión a hierro, RmpM, proteína periplasmática de unión a histidina y proteína de intercambio tiol:disulfuro DsbA, lo que está en concordancia con la idea ya mencionada de que cepas diferentes pueden tener proteomas diferentes a pesar de presentar la misma composición proteica

La 2D IEF/SDS-PAGE constituye una mejora con respecto a la electroforesis 1D-SDS/PAGE al permitir la separación de proteínas de igual peso molecular, pero es una técnica muy desnaturalizante, por lo que no es adecuada para el estudio de las asociaciones que se dan *in vivo* y precisamente ese tipo de asociaciones son de importancia vital tanto para el metabolismo de la bacteria como para el desarrollo de la respuesta inmune, lo que hace necesaria la utilización de otras técnicas menos agresivas (no desnaturalizantes) que posibiliten el estudio de los complejos proteicos tal y como se expresan *in vivo*.

**CAPÍTULO II: Análisis de los complejos de proteínas de  
membrana externa mediante electroforesis bidimensional  
diagonal dSDS-PAGE.**



## 1. Introducción

### 1.1 Electroforesis diagonal

La electroforesis bidimensional diagonal en gel (dSDS-PAGE)<sup>197</sup> es un tipo de electroforesis bidimensional en el que las proteínas se separan en las dos dimensiones según su masa mediante la aplicación secuencial de dos SDS-PAGE perpendiculares. Para ello, los carriles en que se ha corrido la primera dimensión se cortan y colocan en la parte superior de los geles correspondientes a la segunda dimensión. Como resultado, las proteínas que presentan igual movilidad en ambas dimensiones se sitúan formando una diagonal. Los patrones de dispersión de los puntos con respecto a la diagonal permiten la caracterización de las proteínas con movilidad diferencial. La resolución de la técnica es mucho mayor que la proporcionada por la 1D-SDS-PAGE<sup>198,199</sup> y puede incrementarse mediante el cambio de las concentraciones de acrilamida, la composición del tampón utilizado o de las condiciones de electroforesis.

La utilización de geles con distintas concentraciones de acrilamida en la primera y la segunda dimensión proporciona una mayor resolución debido a que la movilidad de los complejos proteicos es dependiente de la concentración,<sup>200,201</sup> característica que comparten

<sup>197</sup> **Sommer A, Traut RR.** Diagonal polyacrylamide-dodecyl sulfate gel electrophoresis for the identification of ribosomal proteins crosslinked with methyl-4-mercaptobutyrimidate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1974; 71: 3946–3950.

<sup>198</sup> **Rais I, Karas M, Schägger H.** Two-dimensional electrophoresis for the isolation of integral membrane proteins and mass spectrometric identification. *Proteomics*. 2004; 4: 2567–2571.

<sup>199</sup> **Burré J, Beckhaus T, Schägger H, Corvey C, Hofmann et al.** Analysis of the synaptic vesicle proteome using three gel-based protein separation techniques. *Proteomics*. 2006; 6: 6250–6262.

<sup>200</sup> **Swank RT, Munkres KD.** Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate. *Anal Biochem*. 1971; 39: 462–477.

<sup>201</sup> **Reynolds JA, Tanford C.** Binding of dodecyl sulfate to proteins at high binding ratios. Possible implications for the state of proteins in biological membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1970; 66: 1002–1007.

con las proteínas muy básicas, las glicoproteínas y las proteínas hidrofóbicas, que tienen una mayor capacidad de unión al SDS que las solubles. El efecto provocado por la unión diferencial es más pronunciado en geles con poros grandes ( $\leq 10\%$ ), lo que permite obtener patrones de dispersión específicos en la diagonal al utilizar distintas concentraciones de acrilamida. Un efecto similar se consigue al variar la proporción del agente de entrecruzamiento bisacrilamida.<sup>202</sup>

La utilización de urea en la composición del gel influencia la movilidad electroforética de las proteínas por interferencia con la unión de SDS, afectando a la dispersión de las proteínas altamente hidrofóbicas.<sup>198</sup>

Otro tipo de modificación que permite aumentar la sensibilidad de la técnica es el cambio de la glicina presente en el tampón por otros iones con distinta movilidad electroforética, como la tricina<sup>203</sup> o la bicina, que se considera especialmente adecuada para aumentar la resolución de las muestras de proteínas de membrana.<sup>202</sup>

La electroforesis diagonal también se utiliza como paso final en procesos de purificación y como herramienta para la determinación de la masa molecular, estado de oligomerización y composición de las subunidades de complejos proteicos previamente purificados, pues la masa aparente de los complejos homo y heterooligoméricos será la suma de las masas de sus componentes multiplicada por su estequiometría.

---

<sup>202</sup> **Williams TI, Combs JC, Thakur AP, Strobel HJ, Lynn BC.** A novel Bicine running buffer system for doubled sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of membrane proteins. *Electrophoresis*. 2006; 27: 2984–2995.

<sup>203</sup> **Schägger H.** Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc*. 2006; 1: 16–22.



En estudios previos realizados en nuestro laboratorio<sup>195</sup> se utilizó un método que permite la resolución de complejos de proteínas de membrana e identifica además, proteínas con movilidad dependiente de la temperatura mediante la aplicación de distintas condiciones de preparación de la muestra previas a cada una de las dimensiones y la incubación de la misma a diferentes temperaturas.

## 1.2 Relevancia del estudio de complejos en el desarrollo de vacunas.

### *Epitopos conformacionales y compartidos.*

Un posible fallo en los estudios destinados al desarrollo de vacunas radica en que las técnicas utilizadas para el análisis de los antígenos presentes en los candidatos vacunales normalmente no permiten el análisis de los antígenos en su conformación nativa. Esto da lugar a que epitopos conformacionales relevantes presentes en los complejos proteicos no sean detectados, por lo que es importante estudiar tanto las interacciones que existen entre los antígenos localizados en las OMVs cuando estos se encuentran en su conformación nativa como el reconocimiento de esos antígenos por el sistema inmune. Así, las interacciones proteína-proteína pueden resultar en la formación de lugares de unión y epitopos que no están presentes en las proteínas individuales o bien en el enmascaramiento de epitopos presentes en las proteínas aisladas.<sup>204</sup> Investigaciones recientes demuestran que los epitopos conformacionales juegan un papel fundamental en la respuesta inmune contra muchos microorganismos patógenos.<sup>205</sup> Tanto

---

<sup>204</sup> **Lund T, Delves PJ.** Immunological analysis of epitopes on hCG. *Rev Reprod.* 1998; 3: 71–76

<sup>205</sup> **Ito HO, Nakashima T, So T, Hirata M, Inoue M.** Immunodominance of conformation-dependent B-cell epitopes of protein antigens. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 308: 770–776.

en *N. meningitidis*<sup>206,207</sup> como en *N. gonorrhoeae*<sup>208,209</sup> se ha demostrado la existencia de algunos complejos antigénicos, hecho no trivial puesto que estas asociaciones pueden determinar la formación de epitopos no lineales de gran relevancia en el desarrollo de la respuesta inmunitaria. La identificación de antígenos con esta clase de epitopos supondría un avance definitivo en el desarrollo de una vacuna eficaz contra la enfermedad meningocócica, especialmente en el caso del serogrupo B, en el que las proteínas de membrana externa son las principales dianas de la respuesta inmunitaria. Por ello, teniendo en cuenta que las porinas de *Neisseria meningitidis* son proteínas mayoritarias en la membrana externa, y puesto que la PorA es el componente principal de varias de las vacunas que actualmente se están desarrollando, se hace necesario estudiar cuál es la relación exacta entre las porinas PorA y PorB en condiciones naturales en la bacteria.

Analizaremos pues los complejos de proteínas presentes en las cepas de *N. meningitidis* y *N. lactamica* presentes en las cepas indicadas en la **tabla 10** utilizando la técnica de electroforesis diagonal bidimensional (dSDS-PAGE).

---

<sup>206</sup> **Arakere G, Kessel M, Nguyen N, Frasch CE.** Characterization of a stress protein from group B *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol.* 1993; 175: 3664–3668.

<sup>207</sup> **Sánchez S, Abel A, Arenas J, Criado MT, Ferreirós CM.** Cross-linking analysis of antigenic outer membrane protein complexes of *Neisseria meningitidis*. *Res Microbiol.* 2006; 157: 136–142.

<sup>208</sup> **Newhall WJ, Wilde CE, Sawyer WD, Haak RA.** High-Mr antigenic protein complex in the outer membrane of *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun.* 1980; 27: 475–482.

<sup>209</sup> **Pannekoek Y, van Putten JPM, Dankert J.** Identification and molecular analysis of a 63–kilodalton stress protein from *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol.* 1992; 174: 6928–6937.

## 2. Material y métodos

### 2.1 Cepas bacterianas, origen, características, conservación y cultivo.

Las características de las cepas utilizadas en este estudio se indican en la **tabla 10**.

**Tabla 10:** Características de las cepas estudiadas

Especie	Cepa	Origen	Serogrupo	Serotipo/ subtipo	ST/ Complejo clonal
<i>N. meningitidis</i>	B16B6	Cepa de referencia	B	2a:P1.2	ST-11, ET-37
<i>N. meningitidis</i>	M982	Cepa de referencia	B	9:P1.9	ST-5
<i>N. meningitidis</i>	Nm30	LCR	C	2b:P1.2	ST-8, A4
<i>N. meningitidis</i>	2851	Cepa H44/76	B	15:P1.7,16	ST-32,ET-5
<i>N. meningitidis</i>	3050	Mutante <i>Knock-out</i> (2851 PorA-)	B	15: (-)	ST-32,ET-5
<i>N. meningitidis</i>	3103	Mutante <i>Knock-out</i> (2851 PorB-)	B	(-):P1.7,16	ST-32,ET-5
<i>N. meningitidis</i>	3043	Mutante <i>Knock-out</i> (2851 FetA-)	B	15:P1.7,16	ST-32,ET-5
<i>N. meningitidis</i>	2851 RmpM-	Mutante <i>Knock-out</i> (2851 RmpM-)	B	15:P1.7,16	ST-32,ET-5
<i>N. meningitidis</i>	3059		B	NT:P1.22,9	ST-275, Burst 1
<i>N. meningitidis</i>	3091	Mutante <i>Knock-out</i> (3059 PorA-)	B	NT: (-)	ST-275, Burst 1
<i>N. meningitidis</i>	3094	Mutante <i>Knock-out</i> (3059 Por B-)	B	(-):P1.22,9	ST-275, Burst 1
<i>N. lactamica</i>	NIP2	Orofaringe	N.A	N.A	
<i>N. lactamica</i>	NIP3	Orofaringe	N.A	N.A	

Las condiciones de conservación y cultivo fueron las mismas que se utilizaron en el capítulo anterior (ver capítulo I, Material y Métodos).

### 2.2 Extracción de vesículas de membrana externa (OMVs).

Las OMVs se obtuvieron mediante extracción con prensa de French utilizando el protocolo indicado en el capítulo anterior (ver capítulo I, Material y Métodos).

### 2.3 Obtención y conservación de sueros.

El protocolo utilizado para la obtención del suero anti-OMVs de la cepa *N. meningitidis* M982 fue el indicado en el capítulo anterior (ver capítulo I, Material y métodos). El anticuerpo monoclonal contra epitopos conservados de la proteína PorA (mab 91-P1.C) fue amablemente cedido por los Drs. W. Zollinger y E. Moran (Walter Reed Army Institute, U.S.A.), el anti-PorB (mab F1.9H10/1B3) por el Dr. A. Silva (Instituto Adolfo Lutz, Brasil), el anti-RmpM (mab 185-H8) por los Drs. E. Rosenqvist y J. Kolberg (Instituto Nacional de Salud Pública, Noruega) y el anti-Opa (mab4B12/C11) por el Dr. G. Morelli (Max Planck Institut für Infektionsbiologie, Alemania).

### 2.4 Electroforesis bidimensional diagonal (dSDS-PAGE).

El análisis de la asociación de proteínas de membrana externa se llevó a cabo mediante electroforesis diagonal.

- En ambas dimensiones se utilizó SDS-PAGE en geles en gradiente del 7.5-15% y condiciones estándar (200V, 1h).
- Las muestras conteniendo 40 µg de OMVs se disolvieron 1:1 en tampón de muestra 2x (glicerol al 10% (v/v), SDS al 2% (p/v), 2-β-mercaptoetanol 0.7M y azul de bromofenol al  $1,25 \times 10^{-3}$  (v/v)).
- Tras correr la primera dimensión, los carriles fueron cortados, introducidos en recipientes con tampón de muestra e incubados a 95° C 10 min. Las tiras se colocaron en la parte superior de los geles de la segunda dimensión, se cubrieron con agarosa al 0.5% (Bio-Rad ReadyPrep™ Overlay Agarose 0.5% en TBS con azul de bromofenol (Bio-Rad Lab., Richmond, CA, USA)) y se llevó a cabo la segunda electroforesis.
- Los geles obtenidos bien se tiñeron con Coomassie Brilliant Blue.

### 2.5 Electrotransferencia a membranas de PVDF.

Según el protocolo indicado en el capítulo anterior.

### 2.6 Inmunodetección.

En este estudio se utilizaron los sueros monoclonales  $\alpha$ -PorA,  $\alpha$ -PorB,  $\alpha$ -RmpM y  $\alpha$ -Opa y el suero específico contra la cepa de *N. meningitidis* M982. Todos ellos fueron obtenidos en ratón y se utilizaron a una dilución de 1:1000.



### 3. Resultados.

#### 3.1 Electroforesis bidimensional diagonal/SDS-PAGE.

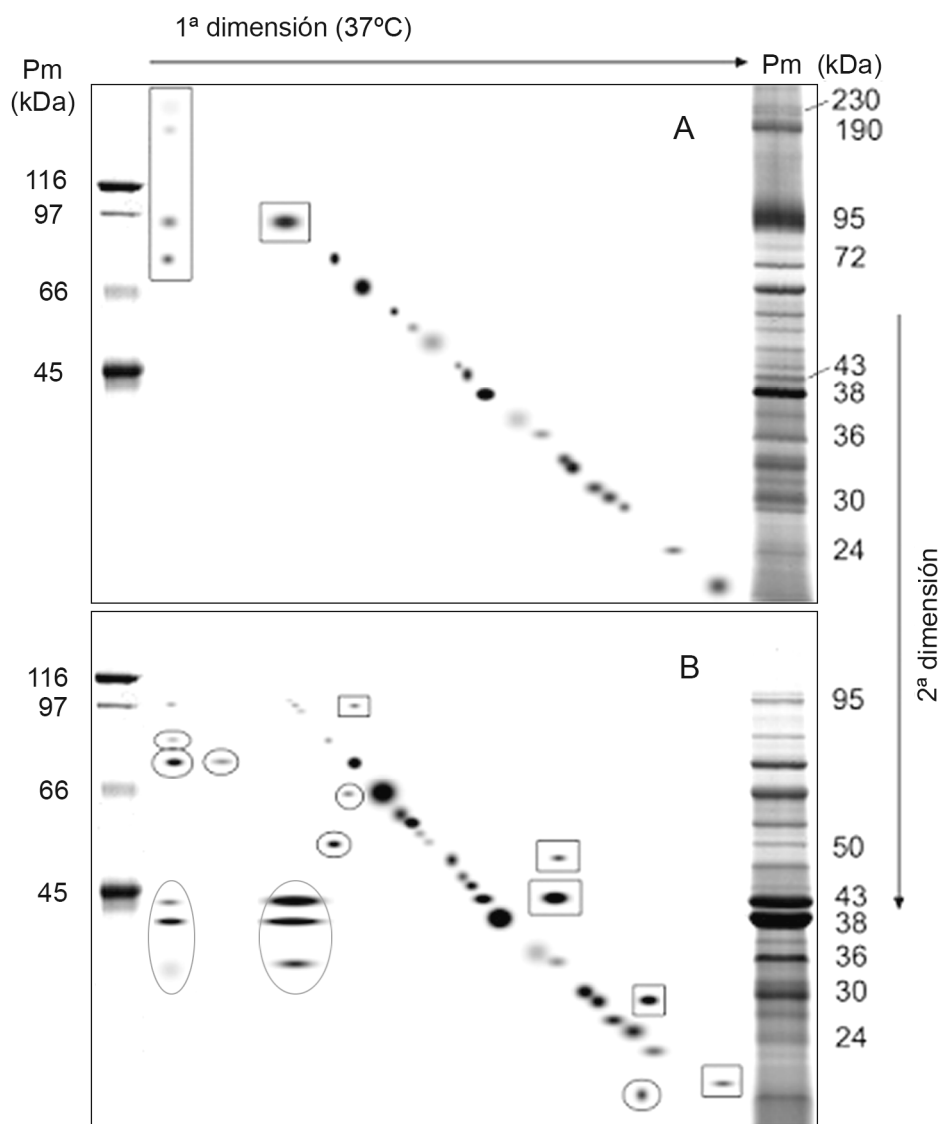
##### 3.1.1 Análisis proteómico.

Para analizar la composición de los complejos de proteínas de membrana externa presentes en *N. meningitidis* y *N. lactamica*, se optó por la utilización de la electroforesis bidimensional diagonal/SDS-PAGE (dSDS-PAGE). En todos los casos, la primera dimensión se realizó a temperatura ambiente, mientras que de forma previa a la segunda, las muestras se incubaron a 95°C durante 10 min. (ver Material y métodos) para permitir la desnaturalización de los complejos sensibles al calor. En el caso de la cepa *N. meningitidis* M982 se realizó también una dSDS-PAGE en la que la incubación previa a la segunda dimensión se llevó a cabo a 37°C, para confirmar que la disociación de los complejos se debiese únicamente al efecto de la temperatura.

Al comparar los resultados obtenidos al analizar las OMVs de *N. meningitidis* M982 en cada una de las condiciones anteriormente indicadas (**figura 33**), se observa que cuando la incubación previa a la segunda dimensión se realiza a 37°C (**figura 33 A**), todas las proteínas detectables se localizan en la diagonal, con la excepción de tres puntos con Pm 190, 95 y 72 kDa situados a la izquierda del gel. Cuando la incubación para la segunda dimensión se realiza a 95°C (**figura 33 B**), los 3 puntos señalados anteriormente se disocian parcialmente dando origen a tres nuevos puntos con Pm 43, 38 y 36 kDa (recuadrados en la figura). Del mismo modo, el gran punto que se observa a la altura

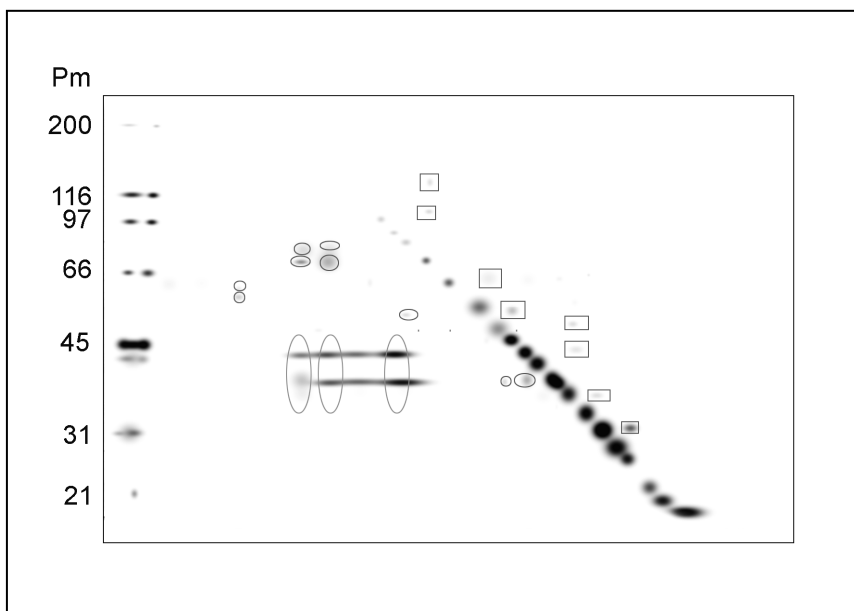
de 95kDa cuando la incubación se realiza a temperatura ambiente se disocia parcialmente dando lugar a tres nuevos puntos con masas idénticas a los anteriores (43, 38 y 36 kDa). También se observan una serie de puntos situados por debajo de la diagonal (de Pm 70, 60, 55 y 20 kDa), mientras que sobre ella se sitúan otros puntos de Pm 95, 50, 43 y 30 kDa, que corresponden a proteínas con movilidad dependiente de la temperatura.



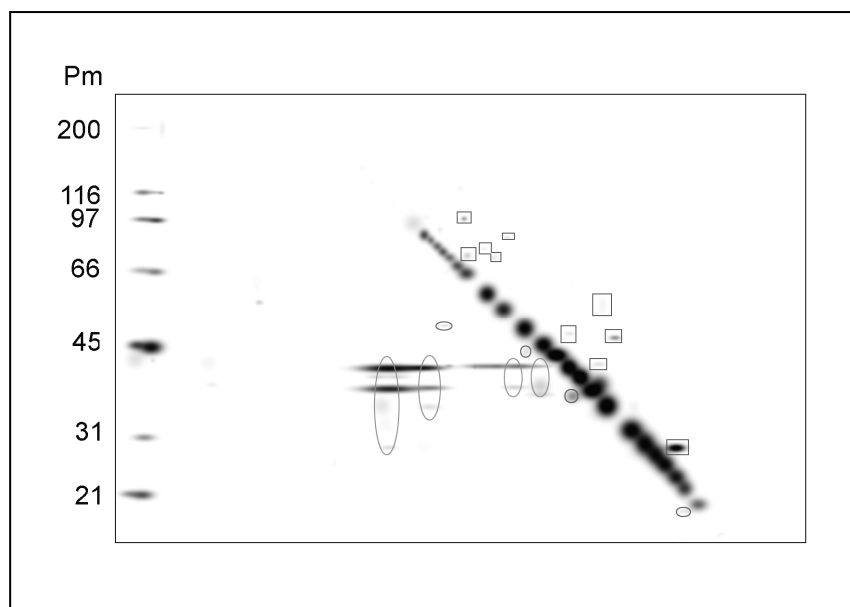


**Figura 33:** Análisis en dSDS-PAGE de OMVs de la cepa *N. meningitidis* M982 tras el tratamiento previo a la segunda dimensión a 37°C (A) o a 95° 10 min. (B) El gel correspondiente a la primera dimensión se presenta a la derecha de la imagen. En la fig. 33A, los posibles complejos se muestran recuadrados; los puntos derivados de la disociación de los complejos (B) están rodeados por círculos y los puntos con movilidad dependiente de la temperatura (B) se señalan con rectángulos. A la derecha se indican los Pm de algunas de los puntos detectados.

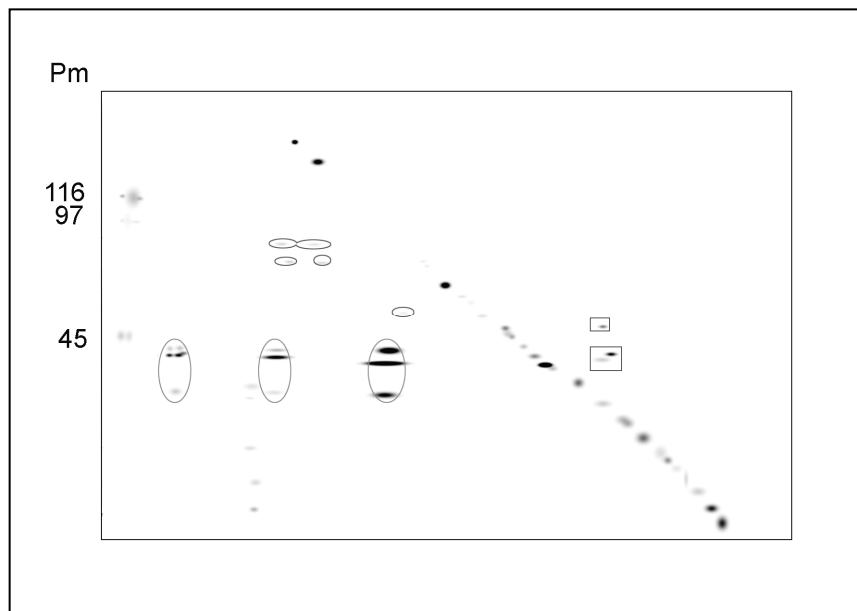
Este patrón de disociación es muy similar en el resto de las cepas salvajes de *N. meningitidis* analizadas (**figuras 34-37**), destacando la ausencia de la proteína de 36 kDa en la cepa Nm30, donde además sólo aparecen sobre la diagonal la proteína de 30 kDa junto con otra de peso molecular similar (**figura 37**).



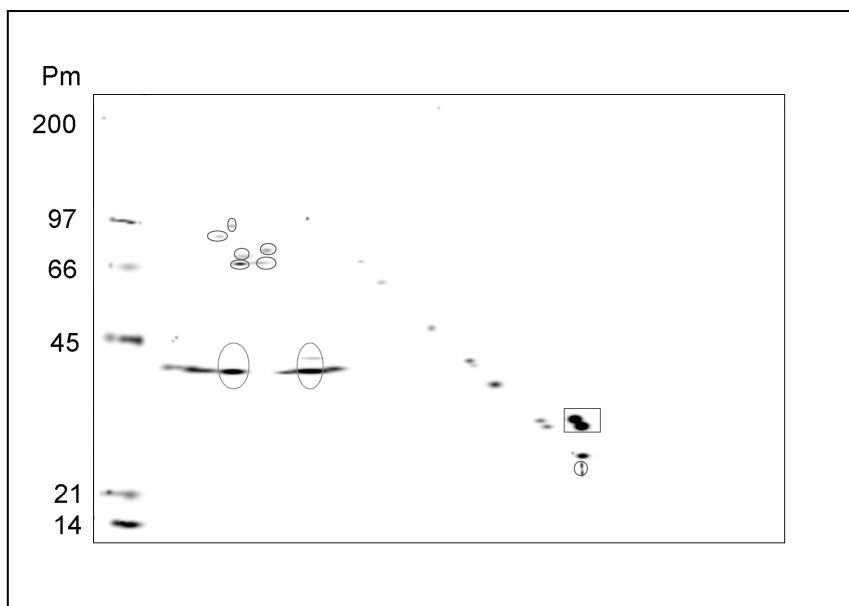
**Figura 34:** Electroforesis bidimensional diagonal/SDS-PAGE de OMVs de la cepa *N. meningitidis* 2851 tras el tratamiento de los geles procedentes de la primera dimensión a 95°C durante 10 min. Los posibles complejos se muestran recuadrados; los puntos derivados de la disociación de los complejos, rodeados por círculos y los puntos con movilidad dependiente de la temperatura se señalan con rectángulos.



**Figura 35:** Electroforesis bidimensional diagonal/SDS-PAGE de OMVs de la cepa *N. meningitidis* 3059 tras el tratamiento de los geles procedentes de la primera dimensión a 95°C durante 10 min. Los posibles complejos se muestran recuadrados; los puntos derivados de la disociación de los complejos, rodeados por círculos y los puntos con movilidad dependiente de la temperatura se señalan con rectángulos.



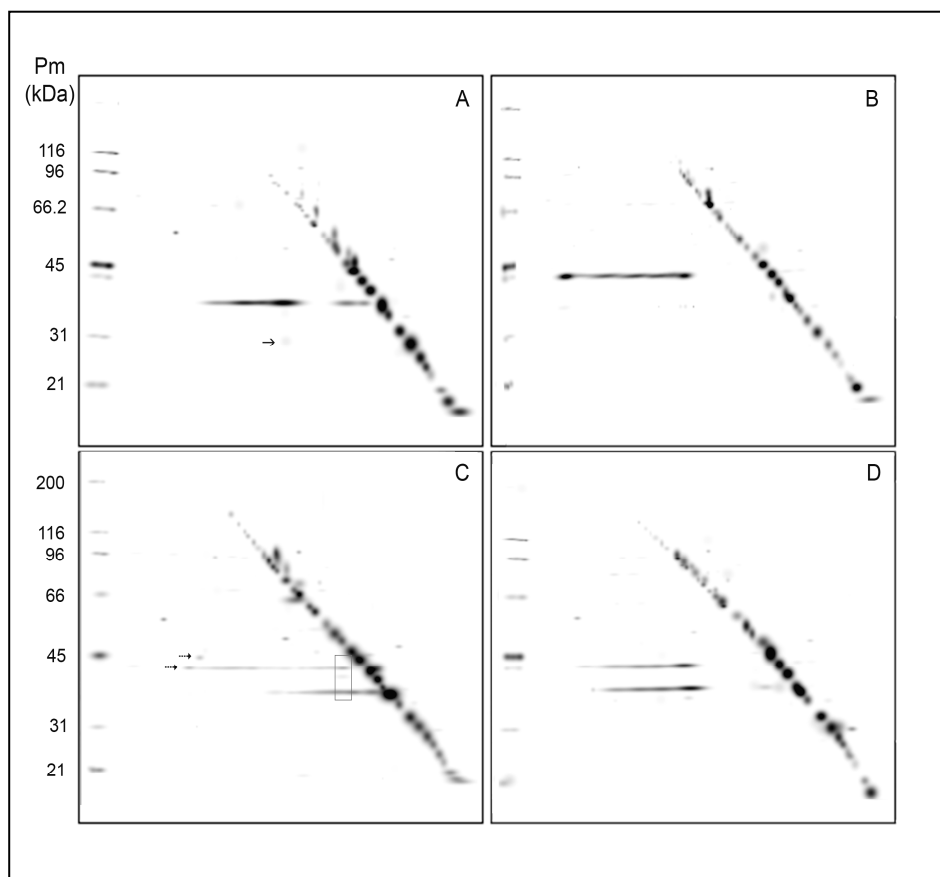
**Figura 36:** Electroforesis bidimensional diagonal/SDS-PAGE de OMVs de la cepa *N. meningitidis* B16B6 tras el tratamiento de los geles procedentes de la primera dimensión a 95°C durante 10 min. Los posibles complejos se muestran recuadrados; los puntos derivados de la disociación de los complejos, rodeados por círculos y los puntos con movilidad dependiente de la temperatura se señalan con rectángulos.



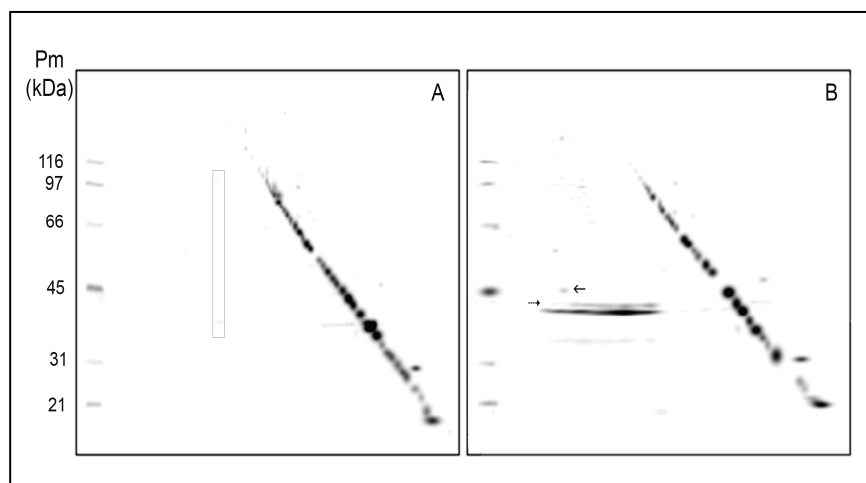
**Figura 37:** Electroforesis bidimensional diagonal/SDS-PAGE de OMVs de la cepa *N. meningitidis* Nm30 tras el tratamiento de los geles procedentes de la primera dimensión a 95°C durante 10 min. Los posibles complejos se muestran recuadrados; los puntos derivados de la disociación de los complejos, rodeados por círculos y los puntos con movilidad dependiente de la temperatura se señalan con rectángulos.

En las cepas mutantes se observa como era de esperar la ausencia de las proteínas en la que cada una de ellas es defectiva. Así, en la cepa 3050 (**figura 38 A**), que corresponde al mutante PorA- de la cepa 2851, no aparece ninguno de los puntos de 43 kDa, correspondientes a la PorA. En este mutante además aparece una proteína de 30 kDa que no está presente en el resto de las cepas (→). La cepa 3103, mutante para la proteína PorB, carece de todos los puntos de 38kDa (**figura 38 B**). En la cepa 2851 RmpM-

(**figura 38 C**) no hay puntos de 36 kDa, pero aparecen dos nuevos de 45 y 43 kDa (→). Correspondiéndose con un Pm de 48 kDa en la diagonal, se localiza un complejo formado por las proteínas PorA, PorB y otra de 40 kDa (recuadrado en la figura). Aunque aparecen complejos de alto peso molecular a una altura similar a los encontrados en la cepa salvaje, éstos están constituidos únicamente por PorA y PorB. La proteína PorB en esta cepa aparece también formando parte de otros complejos de menor Pm (43, 45, 55, 63 y 74 kDa). La cepa 3043, correspondiente a un mutante para la proteína FetA, (**figura 38 D**) no presenta diferencias notables respecto al patrón de 2851. En lo que respecta a los mutantes de la cepa 3059 (**figura 39**), se observa que la concentración de la proteína PorB en la cepa 3091 (**figura 39 A**) es muy inferior a la de la cepa salvaje, de modo que sólo se observa un punto definido por debajo de la posición correspondiente a 175 kDa en la diagonal, que coincide en la vertical con una proteína de 93.6 kDa (recuadrado en la figura). En la cepa 3094 (**figura 39 B**) se observa que por encima de la proteína PorA aparece una banda de Pm 43.2 kDa (→) que está ausente en la cepa salvaje y que forma complejos con la PorA. En esta cepa se observa además otro punto de Pm 45 kDa (←) que tampoco es detectado en la cepa salvaje.



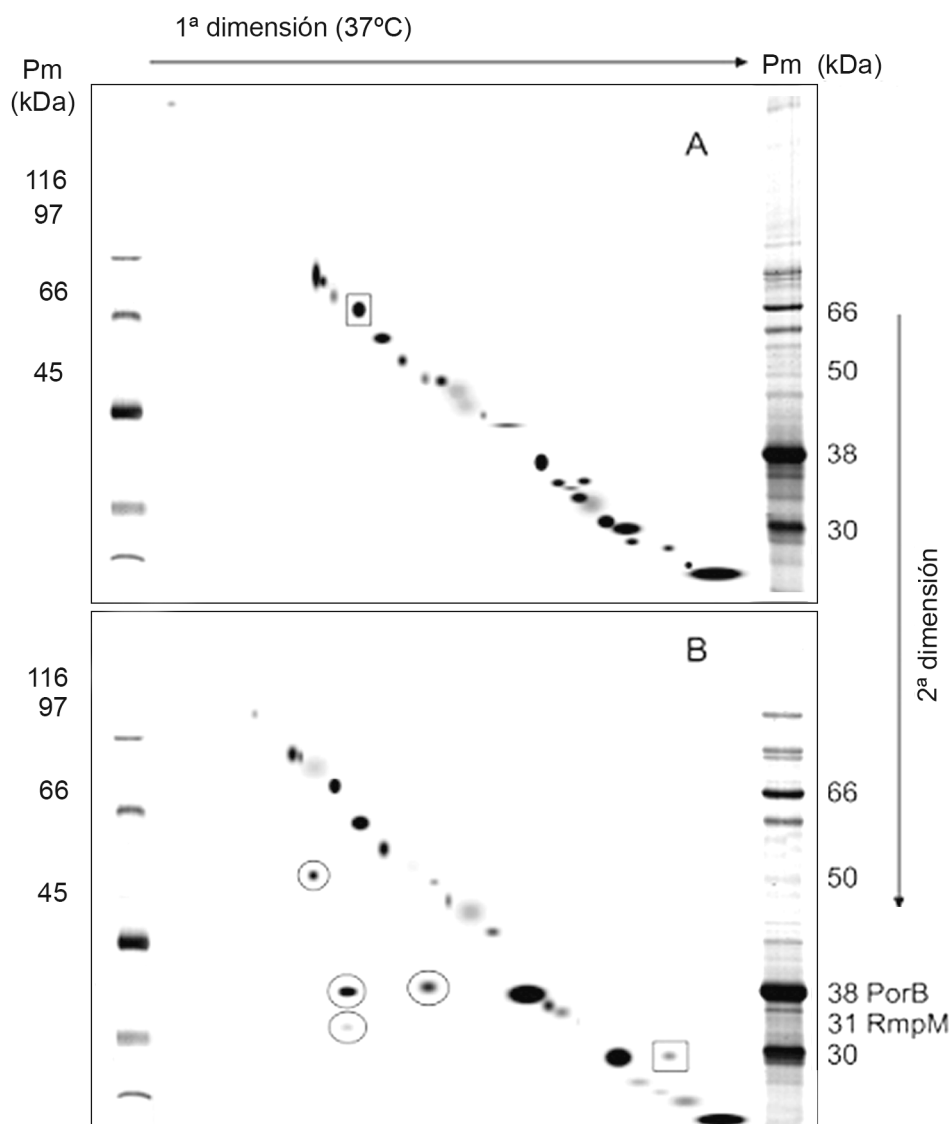
**Figura 38:** Electroforesis bidimensional diagonal/SDS-PAGE de OMVs de las cepas mutantes Knock-out de *N. meningitidis* 2851 tras el tratamiento de los geles procedentes de la primera dimensión a 95°C durante 10 min. (A) *N. meningitidis* 3050 (mutante PorA-); (B) *N. meningitidis* 3103 (mutante PorB-); (C) *N. meningitidis* 2851 RmpM- y (D) *N. meningitidis* 3043 (mutante FetA-).



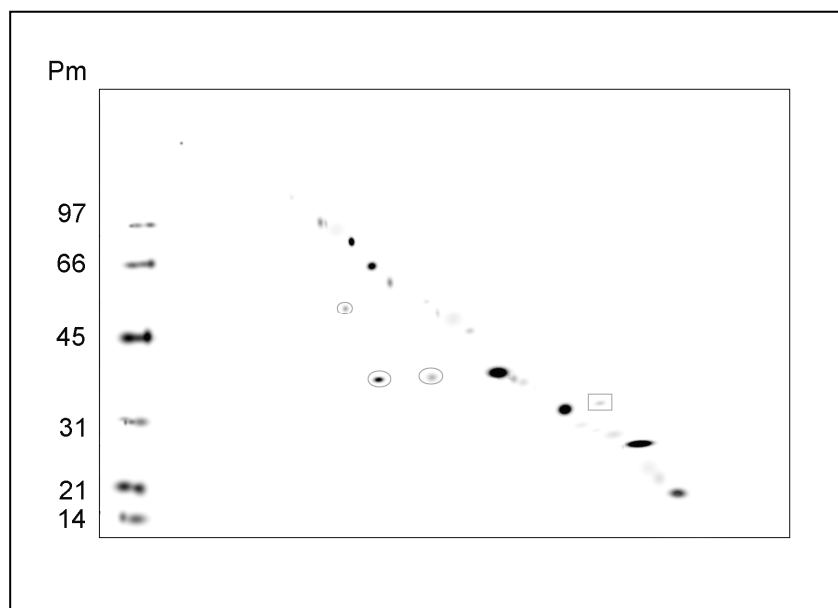
**Figura 39:** Electroforesis bidimensional diagonal/SDS-PAGE de OMVs de las cepas mutantes Knock-out de *N. meningitidis* 3059 tras el tratamiento de los geles procedentes de la primera dimensión a 95°C durante 10 min. (A) *N. meningitidis* 3091 (mutante PorA-); (B) *N. meningitidis* 3094 (mutante PorB-).

Cuando se lleva a cabo una dSDS-PAGE utilizando OMVs de la cepa de *N. lactamica* NIP3 (**figuras 40**) si la muestra se incuba a 37°C de modo previo a la segunda dimensión (**figura 40 A**), todas las proteínas se encuentran formando parte de la diagonal. Cuando la incubación se realiza a 95°C durante 10 min., se observa que la disociación de los complejos da lugar a la aparición de 4 proteínas con Pm 50, 38 y 31 kDa (indicadas con círculos en la **figura 40 B**). También se observa la presencia de un punto de 30 kDa que presenta reducción de movilidad dependiente de temperatura (recuadrado en la figura). Este patrón es compartido por la cepa NIP2 (**figura 41**).





**Figura 40:** Análisis en dSDS-PAGE de OMVs de la cepa *N. lactamica* NIP3 tras el tratamiento previo a la segunda dimensión a 37°C (A) o a 95° 10 min. (B) El gel correspondiente a la primera dimensión se presenta a la derecha de la imagen. En la fig. 40 A, los posibles complejos se muestran recuadrados; los puntos derivados de la disociación de los complejos (B) están rodeados por círculos y los puntos con movilidad dependiente de la temperatura (B) se señalan con rectángulos. A la derecha se indican los Pm de algunos de los puntos detectados.

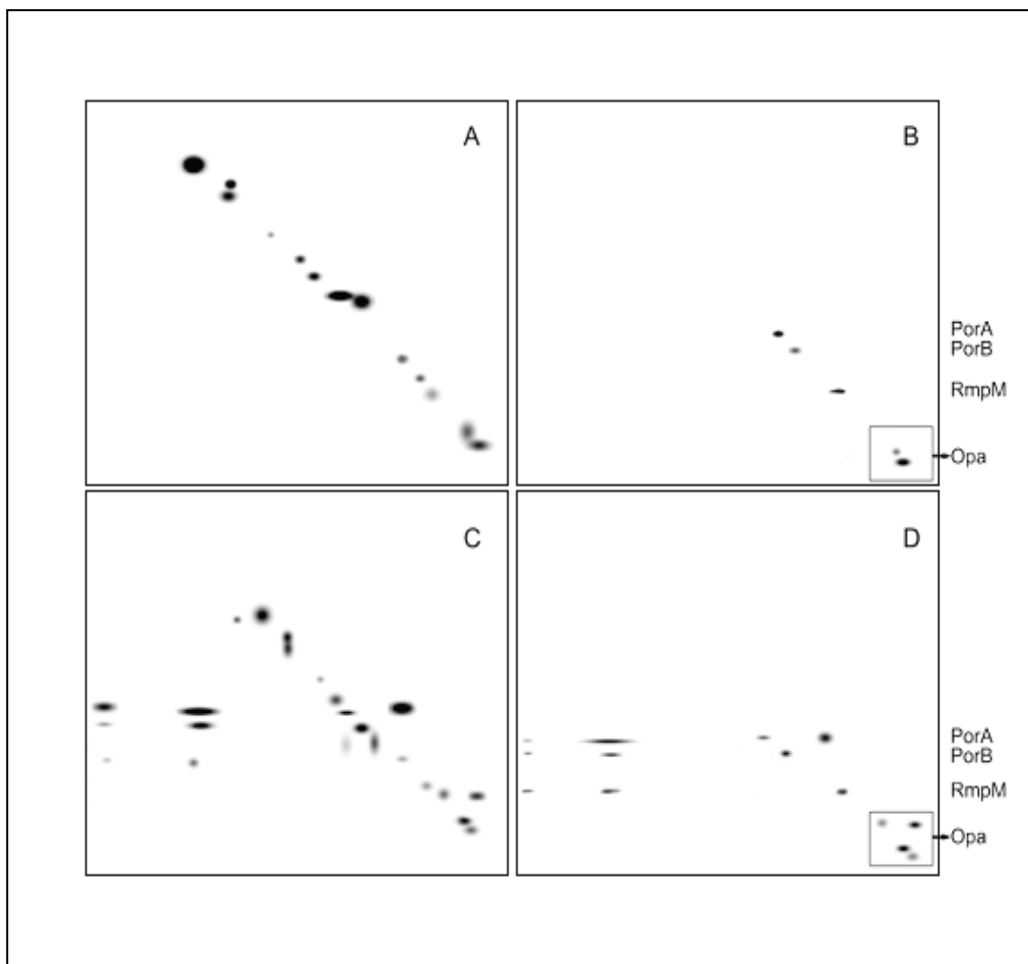


**Figura 41:** Electroforesis bidimensional diagonal/SDS-PAGE de OMVs de la cepa *N. lactamica* NIP2 tras el tratamiento de los geles procedentes de la primera dimensión a 95°C durante 10 min. Los puntos derivados de la disociación de los complejos están rodeados por círculos y aquellos con movilidad dependiente de la temperatura se señalan con rectángulos.

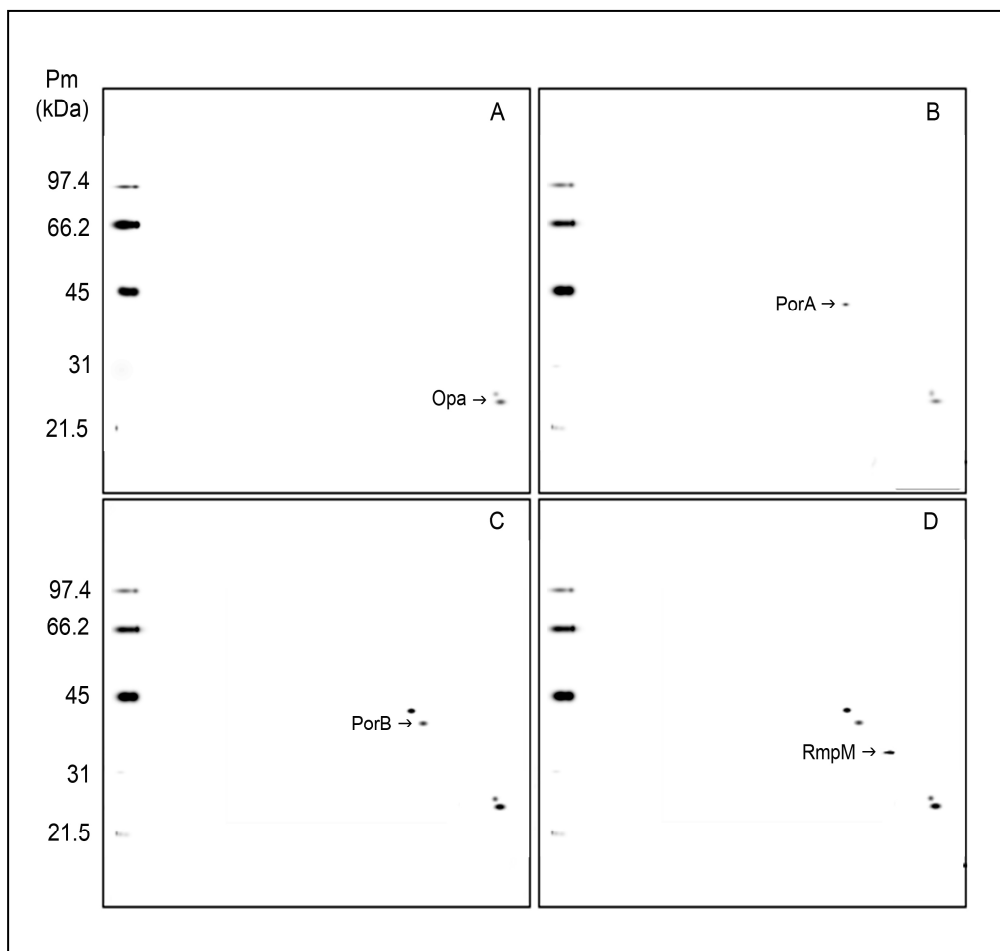
### 3.1.2 Análisis antigénico.

El análisis antigénico se realizó con la cepa M982 debido a la disponibilidad de sueros homólogos anti-OMVs y específicos contra las proteínas de clase 1, 2, 4 y 5 que presenta esta cepa (ver Material y métodos). La determinación de proteínas antigénicas con suero anti-OMVs tras su transferencia a membranas de PVDF revela que los principales antígenos formadores de complejos son las proteínas de 43, 38 y 36 kDa, mientras que el principal antígeno de movilidad reducida es la proteína de 30 kDa (**figura 42**). La

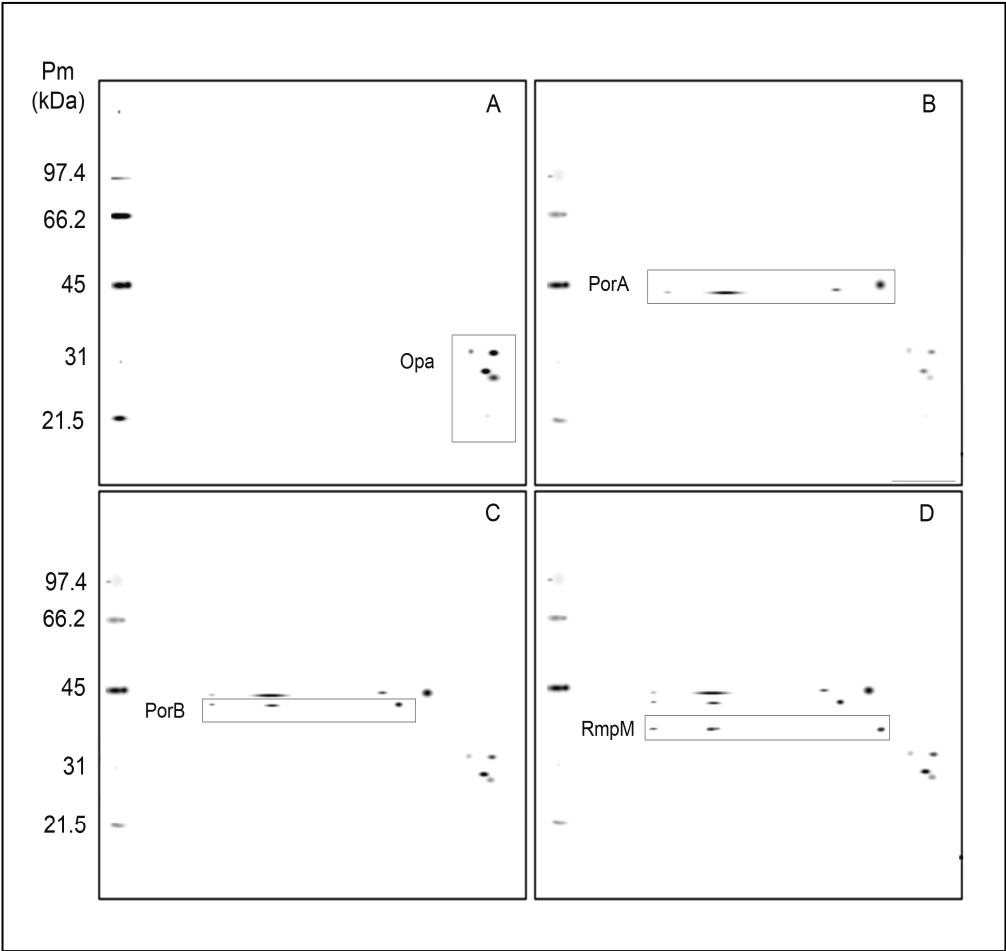
detección de estos antígenos con anticuerpos monoclonales demuestra que las proteínas de 43, 38 y 36 kDa son la PorA, la PorB y la RmpM respectivamente y el antígeno de 30 kDa corresponde a una de las proteínas Opa (**figuras 43 y 44**). Cabe destacar que para cada proteína se detectaron varios puntos antigénicos que se localizan en una misma línea horizontal (excepto en el caso de Opa) tras la electroforesis en condiciones desnaturalizantes. La identificación de estas proteínas como PorA, PorB, RmpM y Opa fue confirmada mediante análisis por MALDI-TOF.



**Figura 42:** Western-blots de las proteínas antigénicas de membrana externa separadas mediante dSDS-PAGE previo tratamiento de las tiras de la primera dimensión a temperatura ambiente (A y B) o a 95°C 10 min. (C y D). En las figuras A y C, la muestra ha sido revelada con un suero anti-OMVs de la cepa M982 obtenido en ratón, mientras que las figuras B y D corresponden a la incubación secuencial con anticuerpos monoclonales anti-PorA, anti-PorB, anti-RmpM y anti-Opa.



**Figura 43:** Incubación secuencial de OMVs de la cepa M982 separadas mediante dSDS-PAGE previo tratamiento de las tiras de la primera dimensión a temperatura ambiente con los anticuerpos monoclonales anti-Opa (A) anti-PorA (B), anti-PorB (C) y anti-RmpM (D).



**Figura 44:** Incubación secuencial de OMVs de la cepa M982 separadas mediante dSDS-PAGE previo tratamiento de las tiras de la primera dimensión a 95°C 10 min. con los anticuerpos monoclonales anti-Opa (A) anti-PorA (B), anti-PorB (C) y anti-RmpM (D).

#### 4. Discusión.

En el presente capítulo se ha utilizado la electroforesis diagonal bidimensional (dSDS-PAGE) para analizar los complejos de porinas presentes tanto en cepas patógenas de *N. meningitidis* y de la especie comensal *N. lactamica* como en los mutantes “knock-out” de *N. meningitidis*.

En general se acepta que las porinas de *Neisseria* aparecen como estructuras homotriméricas formadas por PorA o PorB y estabilizadas por unión con la proteína RmpM y en menor medida se ha considerado que los poros pudiesen estar formados por estructuras heterotriméricas formadas por subunidades de PorA y PorB.<sup>210</sup> Los resultados de este estudio sugieren que los principales complejos de proteínas detectables en la membrana externa de *N. meningitidis* tienen un Pm de 95kDa y están formados por las proteínas PorA (43 kDa), PorB (38-42 kDa) y RmPM (36 kDa) en las cepas salvajes de *N. meningitidis* y por PorB (38 kDa) y RmpM (31 kDa) en *N. lactamica*. Como ya se ha comentado en el capítulo anterior, el menor peso molecular de la RmpM de *N. lactamica* ya establecido en estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio.<sup>141</sup> Minetti y col. demostraron que los complejos de porinas más abundantes son aquellos formados por homotrimeros de PorB<sup>211</sup> y presentan una gran susceptibilidad a la desnaturalización por SDS incluso a bajas temperaturas, lo que dificulta su detección en este tipo de

---

<sup>210</sup> **Nikaido H.** Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. *J Biol Chem.* 1994; 269: 3905–3908.

<sup>211</sup> **Minetti CA, Blake MS, Remeta DP.** Characterization of the structure, function, and conformational stability of PorB class 3 protein from *Neisseria meningitidis*. A porin with unusual physicochemical properties. *J Biol Chem.* 1998; 273: 25329–25338.



experimentos.<sup>212</sup> En nuestro trabajo no se han detectado complejos formados exclusivamente por PorA en ninguna de las cepas salvajes de *N. meningitidis* analizadas, lo cual está en desacuerdo con la estructura propuesta para los poros (formados por homotrímeros de PorA o PorB), si bien la existencia de asociaciones homotriméricas resulta evidente en todas las cepas mutantes analizadas que carecen de uno de los dos tipos de porina. En ellas las proteínas PorA o PorB siempre aparecen asociadas a la proteína RmpM.

Teóricamente, los homotrímeros de PorA presentes en las cepas salvajes deberían tener un Pm de 129 kDa, mientras que los de PorB se encontrarían entre 114 y 126 kDa (debido a la movilidad variable de la PorB en las distintas cepas). Si una única molécula de RmpM se uniese a los poros para estabilizarlos, el Pm del complejo aumentaría en 36 kDa, lo que daría un Pm de 165 kDa para los homocomplejos de PorA y de entre 150 y 162 kDa para los de PorB. En ninguna de las cepas analizadas se detectan puntos con tales movilidades que se disocian tras la desnaturalización, lo que sugiere que la movilidad de los complejos debe de ser mayor de lo esperado debido a lo compacto de su estructura, como ya había sido apuntado por Van Gelder y col.<sup>213</sup> Es posible que el complejo de 95 kDa detectado en condiciones no desnaturalizantes esté formado por una mezcla de homómeros de PorA (de hecho, en los dos mutantes carentes de PorB aparece un complejo situado a esta misma altura) y heterómeros de PorA/PorB (asociados con RmpM), pero esto sólo podría ser cierto si, debido a peculiaridades conformacionales,

---

<sup>212</sup> Minetti CA, Tai JY, Blake MS, Pullen JK, Liang SM *et al.* Structural and functional characterization of a recombinant PorB class 2 protein from *Neisseria meningitidis*. Conformational stability and porin activity. *J Biol Chem.* 1997; 272 :10710–10720.

<sup>213</sup> Van Gelder P, Tommassen J. Demonstration of a folded monomeric form of porin PhoE of *Escherichia coli* in vivo. *J Bacteriol.* 1996; 178: 5320–5322.

ambos complejos tuviesen una estructura muy compleja e idéntica movilidad electroforética aparente a pesar de sus diferentes Pm. En todo caso, no es posible que los homotrómeros de PorB se localizasen en el mismo punto de 95 kDa debido a que, como ya se ha comentado, se disocian en las condiciones utilizadas para este experimento. Por tanto, sugerimos que algunos de los complejos de porinas meningocócicas de membrana externa presentes en condiciones naturales en las cepas salvajes de *N. meningitidis* están formados por heterómeros de PorA y PorB. No obstante, nuestros resultados concuerdan con los datos de Van der Ley y col. en el sentido de la existencia de la PorB como única proteína formadora de poros en *N. lactamica*<sup>106</sup> y sugieren una mayor estabilidad de tales poros que en *N. meningitidis*.

Es de resaltar que en nuestros resultados indican que en *N. meningitidis* se pueden detectar dos tipos diferentes de complejos de porinas formados por las mismas proteínas. El primero de ellos corresponde al punto de 95 kDa y el segundo tiene un Pm mayor y estaría formado por agregados de porinas y otras proteínas localizadas en “islas de membrana” en las membranas nativas (o formados por autoagregación durante el proceso de purificación) y que no entrarían en el gel en condiciones no desnaturizantes. Los cuatro puntos con Pm 230, 190, 95 y 72 kDa detectados en los geles no desnaturizantes podrían corresponder a esos agregados en estados de disociación parcial. Resulta interesante mencionar que los anticuerpos monoclonales utilizados para la detección de PorA, PorB y RmpM no reaccionan con los complejos, lo que sugiere que los epitopos diana no son accesibles desde el exterior.

El estudio del mutante de la cepa 2851 al que se le ha eliminado la proteína RmpM permite observar un desplazamiento de los complejos de porinas hacia regiones de Pm inferior al que ocupan en la cepa salvaje, lo que evidenciaría una desestabilización de los complejos de porinas, indicando la participación de esta proteína en la composición de los complejos, en concordancia con los estudios publicados por Jansen y col.<sup>120</sup>

De nuestros resultados también se puede deducir que, además de las porinas, existen otra serie de proteínas que forman complejos que se resuelven en puntos de 70, 60, 55 y 20 kDa situados bajo la diagonal tras la desnaturalización. Estas proteínas no han sido identificadas en este estudio, si bien la ausencia del punto de peso molecular en torno a 70 kDa en la cepa de *N. meningitidis* carente de FetA- podría sugerir que se trata de esta proteína.

En lo que respecta a las proteínas que aparecen sobre la diagonal, su presencia puede deberse tanto a la ruptura de puentes disulfuro intramoleculares o a la relajación estructural inducida por la temperatura, lo que les proporcionaría una menor movilidad electroforética y un mayor peso molecular aparente, según apuntan Molinari y Helenius.<sup>214</sup> Las proteínas de este tipo mejor descritas en *Neisseria* son la familia de proteínas asociadas a la opacidad de la colonia (Opa),<sup>215</sup> que son factores de virulencia especializados en el reconocimiento célula-huésped y en el tropismo, unión, colonización de la superficie de la mucosa y,

---

<sup>214</sup> **Molinari, M.; Helenius, A.** Analyzing cotranslational protein folding and disulfide formation by diagonal sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. En: *Methods in Enzimology*. Sies H and Packers L (Eds.). Págs. 35–42. 2002. Academic Press. New York.

<sup>215</sup> **Swanson J.** Studies on gonococcus infection. XII. Colony color and opacity variants of gonococci. *Infect Immun.* 1978 ;19: 320–331.

posiblemente, invasión de ciertas células durante el proceso de infección. La expresión de estas proteínas está controlada por mecanismos de variación de fase en los que están implicados un número variable de genes (tres o cuatro en el meningococo y hasta 12 en el gonococo). En las poblaciones naturales de *N. meningitidis*, las células individuales pueden expresar diferentes combinaciones de Opa, cuyo peso molecular varía entre 20 y 32 kDa. Tienen un *pI* básico, estructura trimérica e hipervariabilidad antigénica<sup>127</sup> y de expresión. La dSDS-PAGE resulta muy adecuada para la detección de este tipo de proteínas.

Los estudios de deJonge y col.<sup>216</sup> señalan la existencia de un número variable de Opa en las distintas cepas de *N. meningitidis*. En nuestro caso, la incubación con suero monoclonal anti-Opa revela la presencia de 4 formas diferentes de Opa en la cepa M982, algunas de las cuales no presentan cambios dependientes de temperatura en su movilidad y cuyos pesos moleculares coinciden con los de otras proteínas, lo que dificulta su identificación en 1D-SDS-PAGE. Además de las Opa, el meningococo tiene al menos otras 2 proteínas con movilidad dependiente de temperatura en SDS-PAGE, (puntos de 50 y 95 kDa). El punto de 43 kDa situado sobre la diagonal está formado por monómeros plegados de la PorA, como queda demostrado por su reacción con el anticuerpo monoclonal anti-PorA y su identificación por MALDI-TOF.

La dSDS-PAGE utilizando diferentes tratamientos en cada dimensión ha demostrado ser un método rápido, simple y fiable para la

---

<sup>216</sup> de Jonge MI, Hamstra HJ, van Alphen L, Dankert J, van der Ley P. Mapping the binding domains on meningococcal Opa proteins for CEACAM1 and CEA receptors. *Mol Microbiol.* 2003; 50:1005–1015.

detección de complejos multiproteicos mediante su disociación y cambios conformacionales debidos a la influencia de la temperatura.

En conclusión, este método nos ha permitido demostrar la presencia de complejos heteroméricos de porinas PorA/PorB, una buena resolución de las Opa y la evidencia de la presencia de otras proteínas con movilidad dependiente de temperatura.

**CAPÍTULO III: Análisis en condiciones nativas de los complejos  
de proteínas de membrana externa mediante electroforesis  
bidimensional Blue-Native/SDS-PAGE.**



## 1. Introducción

### 1.1 Electroforesis “Blue-Native”

El análisis de las proteínas integrales de membrana requiere su extracción mediante el uso de detergentes, que solubilizan las proteínas hidrofóbicas que forman los complejos de proteínas de membrana, pero también pueden romper las interacciones proteína-proteína. El éxito del proceso depende fundamentalmente de la elección adecuada de detergentes y de las condiciones de solubilización (concentración de detergente, temperatura, presencia de sales...). Sólo los detergentes suaves, predominantemente los no iónicos (n-dodecyl- $\beta$ -D-maltosido, Tritón X-100 o digitonina) son adecuados para el análisis de los complejos de proteínas. Del mismo modo, el análisis electroforético de los complejos intactos sólo es posible en condiciones no desnaturalizantes. El sistema de gel no desnaturalizante más versátil y potente desarrollado hasta el momento es la electroforesis “blue native” en geles de poliacrilamida (BN-PAGE).<sup>217,218</sup> Esta técnica se basa en la unión débil del colorante aniónico Coomassie Brilliant Blue G- 250 (CBB) a todos los complejos de proteínas de membrana y a muchos complejos de proteínas solubles, lo que retiene las interacciones proteína-proteína a la vez que confiere carga negativa al complejo. De este modo se permite la migración de acuerdo con su tamaño a un pH 7.5, que está en el rango fisiológico para la mayoría de los compartimentos celulares, impidiendo la disociación de las subunidades y, por tanto, a la pérdida de la estructura nativa del complejo. La separación de las proteínas solubilizadas en estos geles de poliacrilamida nativos se

---

<sup>217</sup> Schagger H, von Jagow G. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem.* 1991; 199: 223–231.

<sup>218</sup> Wittig I, Braun HP, Schagger H. Blue native PAGE. *Nat Protoc.* 2006; 1: 418–428.



produce en función de la masa molecular, pues los complejos migran a lo largo de los poros de tamaño decreciente hasta alcanzar su límite específico de tamaño de poro.

La BN-PAGE ha demostrado ser un método fiable, manejable y eficiente, proporcionando resultados excelentes en el análisis de complejos de proteínas solubles y de membrana a partir de casi cualquier tipo de material de partida, pues como fue desarrollado desde un principio para la separación de complejos de proteínas de membrana, no presenta problemas para tratarlas, lo que si ocurre en el caso de métodos como el IEF. Este sistema puede, además, separar complejos con mayor resolución que la filtración en gel o los gradientes de densidad de sacarosa, ya que mediante la aplicación de un gel BN-PAGE como primera dimensión a un gel de SDS-PAGE en la segunda los complejos se pueden disociar en sus unidades individuales. La multimerización de los complejos se puede obtener como resultado de dos datos, la masa molecular del complejo separado en la primera dimensión y el número total de subunidades que lo forman. Es importante señalar que las subunidades que pertenecen a un mismo complejo se sitúan en una línea vertical por debajo de la posición del complejo proteico en la primera dimensión y tienen la misma forma de banda, con los mismos puntos focales a lo largo de la vertical, lo que facilita su reconocimiento en el caso de complejos de proteínas de gran abundancia, pero no es fácilmente diferenciable en geles con gran número de proteínas. Otro procedimiento útil es la utilización de una segunda BN-PAGE como segunda dimensión, puesto que permite utilizar bajas concentraciones de detergentes

suaves para obtener una disociación menos rigurosa que la provocada por SDS, lo que resulta adecuado para el estudio de complejos.

El principal problema de la BN-PAGE radica en la dificultad para la estimación adecuada del tamaño de los complejos.<sup>219</sup> La unión inespecífica del CBB a la superficie expuesta de las proteínas es diferente en los marcadores y en la muestra a analizar, lo que lleva a una falsa estimación del peso molecular que se ha calculado en torno a 1.8 veces.<sup>220</sup>

Un método electroforético estrechamente relacionado con la BN-PAGE es la electroforesis “clear-native” (CN-PAGE), que se diferencia del anterior en que a las muestras no se les añade ningún reactivo que provoque un desplazamiento de carga, de manera que las proteínas migran de acuerdo con su propia carga (si su *pI* es menor que 7). La CN-PAGE proporciona una resolución inferior que la BN-PAGE, pero resulta útil para el análisis de supercomplejos lábiles que se pueden disociar en presencia de CBB.<sup>221</sup> Recientemente ha sido descrita una versión de alta resolución de la CN-PAGE,<sup>222</sup> la hrCN-PAGE en la que el CBB del tampón de cátodo es sustituido por una mezcla de detergentes, uno aniónico, el deoxicolato, y otro suave o no

---

<sup>219</sup> Wang ZJ, Xu XP, Fan KQ, Jia CJ, Yang KQ. Sample preparation for two-dimensional blue native/SDS polyacrylamide gel electrophoresis in the identification of *Streptomyces coelicolor* cytoplasmic protein complexes. *J Biochem Biophys Methods*. 2007; 70: 565–572.

<sup>220</sup> Heuberger EH, Veenhoff LM, Duurkens RH, Friesen RH, Poolman B. Oligomeric state of membrane transport proteins analyzed with blue native electrophoresis and analytical ultracentrifugation. *J Mol Biol*. 2002; 317: 591–600.

<sup>221</sup> Wittig I, Schagger H. Advantages and limitations of clear-native PAGE. *Proteomics*. 2005; 5: 4338–4346.

<sup>222</sup> Wittig I, Karas M, Schagger H. High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes. *Mol Cell Proteomics*. 2007; 6: 1215–1225.

iónico, como el n-dodecyl- $\beta$ -D-maltosido o el Tritón X-100, que mantiene la solubilidad de las proteínas, les proporciona una carga neta negativa y aumenta la resolución a un nivel similar al proporcionado por la BN-PAGE.

Es importante señalar que los complejos de membrana separados tanto por BN-PAGE como por CN-PAGE mantienen su forma enzimáticamente activa, lo que permite la realización de ensayos de actividad en gel.<sup>223,224</sup> Las proteínas nativas también se pueden electroeluir del gel para su posterior reconstitución y análisis mediante técnicas como la cristalización 2D o la microscopía electrónica.<sup>225,226</sup>

### 1.2 Otras técnicas de estudio de complejos: Ventajas e inconvenientes

A la hora de estudiar los complejos de proteínas de membrana externa es de crucial importancia mantener la estructura de los mismos. En la mayor parte de las técnicas de separación es necesario romper la estructura lipídica de la membrana antes de llevar a cabo el análisis. Este paso provocará la disociación del complejo, lo que hace necesario el uso de detergentes que estabilicen los complejos en ausencia de membrana lipídica intacta, siendo los más utilizados con

<sup>223</sup> **Jung C, Higgins CM, Xu Z.** Measuring the quantity and activity of mitochondrial electron transport chain complexes in tissues of central nervous system using blue native polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem.* 2000; 286: 214–223.

<sup>224</sup> **Sunderhaus S, Dudkina NV, Jansch L, Klodmann J, Heinemeyer J et al.** Carbonic anhydrase subunits form a matrix-exposed domain attached to the membrane arm of mitochondrial complex I in plants. *J Biol Chem.* 2006; 281: 6482–6488.

<sup>225</sup> **Neff D, Dencher NA.** Purification of multisubunit membrane protein complexes: isolation of chloroplast FoF1–ATP synthase, CFo and CF1 by blue native electrophoresis. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 259: 569–575

<sup>226</sup> **Poetsch A, Neff D, Seelert H, Schagger H, Dencher NA.** Dye removal, catalytic activity and 2D crystallization of chloroplast H(+)-ATP synthase purified by blue native electrophoresis. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1466: 339–349.

este fin Triton X-100, óxido de lauril dimetil amina, octil- $\beta$ -glucopiranosido o n-dodecyl- $\beta$ -D-maltosido.

Entre las técnicas de separación utilizadas en la actualidad para la separación de complejos de proteínas de membrana destacan:<sup>227,162</sup>

- *Uso de “affinity tags”*: Son métodos de purificación de proteínas *in vivo* que se fundamentan en la utilización de proteínas recombinantes marcadas con moléculas pequeñas unidas genéticamente a la proteína y que permiten la purificación por afinidad de la misma.<sup>228</sup> Estos métodos posibilitan la identificación de los complejos en condiciones nativas y resultan útiles para la identificación de complejos formados por muchos componentes. Sin embargo, también van a tener una serie de problemas, debidos principalmente a que parte de la proteína marcada aparece en formas no fisiológicas, generando interacciones que no se dan *in vivo*. Además, el método tiene un sesgo hacia las proteínas de mayor afinidad, de gran abundancia o aquellas con cinética de disociación más baja.<sup>229</sup> Otros problemas son los derivados del marcaje, ya que la introducción de una etiqueta exógena puede generar problemas de citotoxicidad o influir en la interacción entre proteínas, reduciendo la afinidad entre ellas u ocultando la propia etiqueta e impidiendo la recuperación del complejo.

---

<sup>227</sup> Hooker BS, Bigelow DJ, Lin CT. Methods for mapping of interaction networks involving membrane proteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 363: 457–461.

<sup>228</sup> Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, Eilm M, Mann S. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol*. 1999; 17: 1030–1032.

<sup>229</sup> von Mering C, Krause R, Snel B, Cornell M, Oliver SG *et al*. Comparative assessment of large-scale data sets of protein-protein interactions. *Nature*. 2002; 417: 399–403.

- *Purificación por afinidad en tándem (TAP-tag)*: En este caso se utiliza una etiqueta TAP, formada por dos etiquetas de afinidad secuenciales separadas por un lugar de rotura para la proteasa del virus del mosaico del tabaco, fusionada específicamente a una proteína. La utilización de una etiqueta TAP permite realizar una doble purificación, reduciendo la unión no específica en comparación con otras técnicas basadas en afinidad. La principal desventaja del método radica en que las proteínas poco abundantes se pueden perder en los lavados, siendo necesaria una cantidad de material de partida bastante grande.

Todas las técnicas que utilizan etiquetas de afinidad son exógenas, pues exigen la utilización de proteínas que puedan ser expresadas de forma heteróloga, lo que en la mayoría de los casos excluye a las proteínas de membrana, de hecho este tipo de estudios sólo se han completado en los organismos modelo *Sacharomices cerevisiae*<sup>230</sup> y *Escherichia coli*,<sup>231</sup> en los que los protocolos de transfección están perfectamente establecidos.

El aislamiento de complejos de proteínas de membrana mediante técnicas de afinidad es difícil debido a la necesidad de solubilizar la membrana y eliminar los detergentes de forma previa a su identificación mediante LC-MS/MS, razón por la que la cantidad de datos existentes para este tipo de proteínas es muy limitada.

---

<sup>230</sup> **Gavin AC, Bösch M, Krause R, Grandi P, Marzioch M et al.** Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature*. 2002; 415:141–147.

<sup>231</sup> **Butland G, Peregrín-Alvarez JM, Li J, Yang W, Yang X, et al** Interaction network containing conserved and essential protein complexes in *Escherichia coli*. *Nature*. 2005; 433: 531–537.

- *Sistema del doble híbrido*: En este sistema la proteína cebo se expresa en una levadura como proteína quimérica fusionada al dominio de unión de DNA de un factor de transcripción. El resto de las proteínas blanco contra las que se va a probar el cebo se expresan en la misma célula fusionadas con el dominio activador del mismo factor de transcripción. Cuando las dos proteínas se unen, ambos dominios estarán suficientemente cerca como para que el factor de transcripción sea funcional y permita la activación de un gen que posibilite el crecimiento de la levadura en un determinado medio. La principal ventaja de este método se encuentra en que se manipula DNA y no proteínas para estudiar las interacciones proteína-proteína, no siendo necesaria la purificación de los complejos formados. Además, es un método de alto rendimiento que permite el estudio de todos los complejos presentes en un determinado organismo.<sup>232- 235</sup> Como desventaja, este método sólo permite la detección de interacciones binarias y presenta un alto porcentaje tanto de falsos positivos<sup>236</sup> (hasta el 50%) como de falsos negativos<sup>237</sup> (64%), de modo que los resultados obtenidos exigen comprobación utilizando otros métodos.

---

<sup>232</sup> Uetz P, Giot L, Cagney G, Mansfield TA, Judson RS *et al.* A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*. 2000; 403: 623–627.

<sup>233</sup> Li S, Armstrong CM, Bertin N, Ge H, Milstein S *et al.* A map of the interactome network of the metazoan *C. elegans*. *Science*. 2004; 23: 540–543.

<sup>234</sup> Giot L, Bader JS, Brouwer C, Chaudhuri A, Kuang B, *et al* A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science*. 2003; 302: 1727–1736.

<sup>235</sup> Rual JF, Venkatesan K, Hao T, Hirozane-Kishikawa T, Dricot A, *et al.* Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature*. 2005; 437: 1173–1178.

<sup>236</sup> Sprinzak E, Sattath S, Margalit H. How reliable are experimental protein-protein interaction data? *J Mol Biol*. 2003; 11: 919–923.

<sup>237</sup> Deng M, Mehta S, Sun F, Chen T. Inferring domain-domain interactions from protein-protein interactions. *Genome Res*. 2002;12: 1540–1548.

- *Fluorescencia por transferencia de energía resonante (FRET)*: Es una técnica desarrollada específicamente para el estudio de las interacciones entre proteínas de membrana. Se fundamenta en la transferencia de energía que entre dos proteínas fluorescentes fusionadas a dos proteínas que presuntamente interaccionan entre sí.<sup>238</sup> La tasa de falsos positivos de este método es baja, pero la de falsos negativos es bastante alta, pues las proteínas a analizar tienen que estar muy cerca (a un máximo de 100 Å). Al ser necesario fabricar proteínas de fusión adecuadas para cada una de las interacciones a analizar, esta técnica es adecuada para el estudio de complejos concretos, pero no para el del complexoma de membrana total de una determinada célula.
- *Métodos de fluorescencia*: Espectroscopia de correlación de fluorescencia (FCS) y espectroscopia de correlación cruzada de fluorescencia (FCCS). Son métodos muy sensibles que permiten la detección y análisis de moléculas individuales. La FCS permite determinar directamente la masa del complejo a partir de su coeficiente de difusión translacional;<sup>239</sup> la FCCS de dos colores permite tanto la determinación de complejos en operaciones de alto rendimiento como la medición de la estequiometría de las interacciones proteína-proteína.<sup>240</sup> Al igual que en FRET es necesaria la presencia de un “tag” de fluorescencia, pero la gran sensibilidad del método permite realizar mediciones en

<sup>238</sup> **Matyus L.** Fluorescence resonance energy transfer measurements on cell surfaces. A spectroscopic tool for determining protein interactions. *J Photochem Photobiol B*. 1992; 12: 323–337.

<sup>239</sup> **Verma S, Xiong Y, Mayer MU, Squier TC.** Remodeling of the bacterial RNA polymerase supramolecular complex in response to environmental conditions. *Biochemistry*. 2007; 46: 3023–3035.

<sup>240</sup> **Stoevesandt O, Brock R.** One-step analysis of protein complexes in microliters of cell lysate using indirect immunolabeling and fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Nat Protoc*. 2006; 1: 223–229.

condiciones fisiológicamente relevantes. Los complejos no tienen que ser físicamente separados, pues la resolución del método depende de la óptica utilizada.

- *Resonancia de plasmón superficial* (SPR): Se fundamenta en la medición de los cambios registrados en el índice de refracción cuando se unen proteínas purificadas a una fase sólida.<sup>241</sup> Esta aproximación está limitada a aquellas proteínas que pueden ser expresadas y purificadas y hay que tener en cuenta que la unión de una proteína a una fase sólida puede afectar a su capacidad para formar complejos.
- *Cofraccionamiento*: Las proteínas que forman parte de un complejo se pueden cofraccionar debido a interacciones específicas del complejo con matrices de intercambio iónico en condiciones nativas.<sup>242,243</sup> A partir de extractos celulares completos se puede cuantificar la distribución de las proteínas en distintas fracciones y realizar perfiles de correlación de proteínas,<sup>244</sup> de modo que aquellas que presenten la misma distribución presumiblemente forman parte de un complejo.
- El “*cross-linking*” químico es una aproximación clásica para la identificación de las interacciones proteína-proteína<sup>245</sup> basada en

---

<sup>241</sup> **Cooper MA.** Label-free screening of bio-molecular interactions. *Anal Bioanal Chem.* 2003; 377: 834–842.

<sup>242</sup> **Shi L, Chen B, Wang Z, Elias DA, Mayer MU et al.** Isolation of a high-affinity functional protein complex between OmcA and MtrC: two outer membrane decaheme c-type cytochromes of *Shewanella oneidensis* MR-1. *J Bacteriol.* 2006; 188: 4705–4714.

<sup>243</sup> **Krall L, Wiedemann U, Unsin G, Weiss S, Domke N et al.** Detergent extraction identifies different VirB protein subassemblies of the type IV secretion machinery in the membranes of *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99: 11405–11410.

<sup>244</sup> **Andersen JS, Wilkinson CJ, Mayor T, Mortensen P, Nigg EA et al.** Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling. *Nature.* 2003; 426: 570–574.

<sup>245</sup> **Phizicky EM, Fields S.** Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol Rev.* 1995; 59: 94–123.



interacción de las proteínas que forman el complejo con un agente químico bifuncional fraccionable y el posterior análisis electroforético de los aductos formados. Existen numerosos reactivos con distintas especificidades que permiten la unión de diferentes tipos de proteínas. Entre las variaciones de esta técnica destaca el uso de reactivos fotoactivables, que permiten el estudio del “cross-linking” de modo dinámico o los reactivos marcados con isótopos, que permiten la detección de péptidos a concentraciones muy bajas. La principal desventaja de este método está en que el reactivo se une a todas las proteínas cercanas, estén o no en contacto directo, generando falsos positivos, razón por la que las interacciones detectadas deben de ser comprobadas independientemente por otros métodos. Entre las ventajas, destacar que es un método que puede realizarse *in vivo* y que permite fijar interacciones débiles que no se detectan por otros métodos.<sup>246</sup> También se puede utilizar para detectar contactos transitorios con distintas proteínas en varios momentos de un proceso dinámico, “congelándolo” en sus distintas fases.

En el presente capítulo utilizaremos la técnica de electroforesis bidimensional blue-native/SDS-PAGE (BN/SDS-PAGE) con el fin de determinar la composición de los complejos de proteínas de membrana externa presentes en distintas cepas de *N. meningitidis* y *N. lactamica* cuando se analizan en condiciones no desnaturalizantes. La información obtenida de este modo se comparará con la resultante del

---

<sup>246</sup> **Melcher K.** New chemical crosslinking methods for the identification of transient protein-protein interactions with multiprotein complexes. *Curr Protein Pept Sci.* 2004; 5: 287–296.

análisis de distintas cepas mutantes de *N. meningitidis* para estudiar la influencia de las proteínas en las que éstos son defectivos en la composición de los complejos de proteínas de membrana externa.



## 2. Material y métodos

### 2.1 Cepas bacterianas, origen, características, conservación y cultivo.

Las características de las cepas utilizadas se indican en la **tabla 11**. Las condiciones de conservación y cultivo fueron las mismas que en los capítulos anteriores (ver capítulo I, Material y métodos).

**Tabla 11:** Características de las cepas estudiadas

Especie	Cepa	Origen	Serogrupo	Serotipo/ subtipo	ST/ Complejo clonal
<i>N. meningitidis</i>	B16B6	Cepa de referencia	B	2a:P1.2	ST-11, ET-37
<i>N. meningitidis</i>	M982	Cepa de referencia	B	9:P1.9	ST-5
<i>N. meningitidis</i>	Nm30	LCR	C	2b:P1.2	ST-8, A4
<i>N. meningitidis</i>	2851	H44/76	B	15:P1.7,16	ST-32,ET-5
<i>N. meningitidis</i>	3050	Mutante <i>Knock-out</i> (2851 PorA-)	B	15: (-)	ST-32,ET-5
<i>N. meningitidis</i>	3103	Mutante <i>Knock-out</i> (2851 PorB-)	B	(-):P1.7,16	ST-32,ET-5
<i>N. meningitidis</i>	3043	Mutante <i>Knock-out</i> (2851 FetA-)	B	15:P1.7,16	ST-32,ET-5
<i>N. meningitidis</i>	2851 RmpM-	Mutante <i>Knock-out</i> (2851 RmpM-)	B	15:P1.7,16	ST-32,ET-5
<i>N. meningitidis</i>	3059	Mutante <i>Knock-out</i> (3059 PorA-)	B	NT:P1.22,9	ST-275, Burst 1
<i>N. meningitidis</i>	3091	Mutante <i>Knock-out</i> (3059 Por B-)	B	NT: (-)	ST-275, Burst 1
<i>N. meningitidis</i>	3094	Mutante <i>Knock-out</i> (3059 Por B-)	B	(-):P1.22,9	ST-275, Burst 1
<i>N. lactamica</i>	NIP0	Orofaringe	N.A	N.A	
<i>N. lactamica</i>	NIP2	Orofaringe	N.A	N.A	
<i>N. lactamica</i>	NIP5	Orofaringe	N.A	N.A	

## 2.2 Extracción de vesículas de membrana externa (OMVs).

### 2.2.1 Extracción de OMVs con Prensa de French

En gran parte de la experimentación, la extracción se llevó a cabo con prensa de French, siguiendo el protocolo indicado en capítulos anteriores.

### 2.2.2 Extracción de OMVs con deoxicolato sódico.

Para este tipo de extracción se siguió una variación del protocolo de Fredicksen *et al.*<sup>247</sup> Las condiciones de cultivo fueron las mismas que en el método anterior (ver Material y métodos en capítulo I). El cultivo celular se centrifugó a  $50\,000 \times g$  durante una hora para decantar las células, que posteriormente se resuspendieron en tampón Tris-HCl 0,1M con EDTA 0,01M y 0,5% (p/v) de deoxicolato sódico, utilizando un volumen, 7,5 mL por gramo de peso húmedo de células. La suspensión resultante se centrifugó a  $200\,000 \times g$  durante 10min y el botón celular se resuspendió en Tris-HCl 0,05M con sacarosa al 3% (p/v). Al igual que en los casos en los que se utilizó prensa de French, la concentración de proteína se determinó utilizando el método BCA (BCA Protein Assay Reagent, Pierce, Rockford, IL, Estados Unidos).

## 2.3 Electroforesis Blue Native (BN-PAGE)

Para un estudio más exhaustivo de las asociaciones entre proteínas de membrana externa se llevó a cabo un análisis mediante electroforesis en condiciones no desnaturalizantes. La técnica elegida

---

<sup>247</sup> Fredriksen JH, Rosenqvist E, Wedege E, Bryn K, Bjune G *et al.* Production, characterization and control of MenB-vaccine "Folkehelsa": an outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease. *NIPH Ann.* 1991; 14: 67–79.

fue la electroforesis Blue-native en geles de poliacrilamida (BN-PAGE), que se realizó siguiendo una modificación del método descrito por Shägger y von Jagow.<sup>217</sup>

- La electroforesis se llevó a cabo utilizando geles concentradores del 4% (p/v) y separadores con un gradiente lineal de poliacrilamida del 8 al 11% (p/v) en tampón de gel 3x, conteniendo bis-tris 150 mM, ácido aminohexanoico 1,5 M, persulfato amónico al 0,05% (p/v), TEMED al 0.05% (p/v), y glicerol al 4.7% (p/v). Los geles de 1,5 mm de grosor fueron elaborados utilizando el sistema Bio-Rad Gradient Former<sup>®</sup> (BioRad Laboratories, Richmond, CA, EEUU).
- Para la preparación de las muestra se utilizaron 15 µg de proteína a una concentración final de 1 µg/µL a los que se le añadió un 10% (v/v) de tampón de muestra [Bis-Tris-HCl 50mM, ácido 6-aminohexanoico (AAH) 1M] y 2.25 µL de n-dodecyl-β-D-maltosido (DDM) al 10% (p/v) para favorecer la solubilización de las proteínas. Tras una incubación de 30 min. a temperatura ambiente, la mezcla se centrifugó (100.000 x g, 15 min., 4°C) para precipitar la proteína no solubilizada. Recuperado el sobrenadante se le añadieron 2,5µL de glicerol y 2,5µL de solución Coomassie G-250 al 5% (p/v) en AAH 1M, procediéndose a su carga en el gel.
- La electroforesis se realizó a 4°C en un sistema Mini-Protean<sup>®</sup>3 Cell (BioRad Laboratories, Richmond, CA, EEUU) a un voltaje constante de 50 V durante 8 horas. Como tampón de cátodo se utilizó tricina 50 mM, bis-tris-HCl 15mM con Coomassie al 0,02% (p/v) a pH 7.0. El tampón de ánodo fue bis-tris-HCl 25 mM a pH 7.0.
- Los geles se tiñeron con Coomassie<sup>®</sup> Brilliant Blue G- 250 o bien fueron cortados para proceder a una segunda dimensión en geles SDS. Los marcadores de alto peso molecular fueron proporcionados por GE

Healthcare (Bukinghamshire, UK)

#### 2.4 *Electroforesis bidimensional Blue Native/SDS-PAGE (2D BN/SDS-PAGE)*

En los casos en los que se llevó a cabo una segunda dimensión, ésta se realizó utilizando geles verticales de poliacrilamida en presencia del detergente aniónico dodecilsulfato sódico (SDS), utilizando el sistema de tampón discontinuo de Laemli.<sup>189</sup> La electroforesis se llevó a cabo en un sistema Mini-PROTEAN® 3 Cell (Bio-Rad Lab., Richmond, CA, USA). Los distintos reactivos fueron suministrados por Bio-Rad lab (Richmond, CA, Estados Unidos).

Como geles separadores se emplearon geles con una concentración de poliacrilamida del 10%.

Las electroforesis se realizaron a un voltaje constante de 200 V durante 1 hora, tras la cual los geles se tiñeron con Coomassie® Brilliant Blue G- 250.

#### 2.5 *Análisis informático de los datos.*

Los geles se digitalizaron utilizando un densitómetro Bio-Rad GS-800 (Bio-Rad Lab., Richmond, CA, USA). Para el análisis de los geles resultantes de la primera dimensión se utilizó el software de análisis 1D Quantity One v. 4.6.3 (Bio-Rad Lab., Richmond, CA, USA). Para el análisis de las imágenes procedentes de la segunda dimensión se utilizó el programa PDQuest versión 7.4.0 de Bio-Rad, con cuyas herramientas se identificaron y enumeraron los puntos correspondientes a las proteínas.

### *2.6 Identificación de proteínas por MALDI-TOF.*

Algunas de las proteínas fueron identificadas mediante análisis por MALDI-TOF (ver capítulo I, Material y Métodos) utilizando un espectrómetro de masas Autoflex de la firma Broker. La búsqueda se realizó utilizando MASCOT.



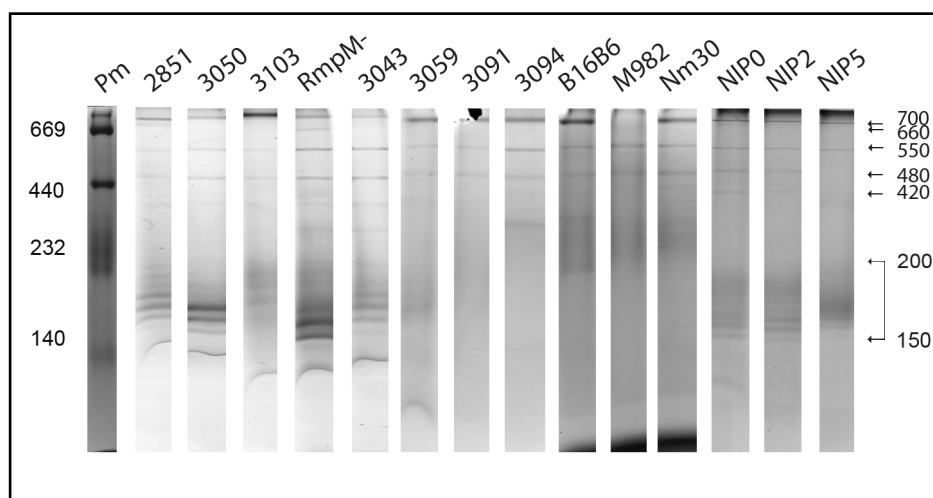


### 3. Resultados.

Con el fin de estudiar la composición de los complejos de proteínas de membrana externa de *N. meningitidis* y *N. lactamica* presentes en condiciones nativas, las muestras de OMVs se sometieron a análisis mediante electroforesis bidimensional utilizando condiciones no desnaturalizantes en las que se sustituye el SDS por otro detergente no iónico más suave en la primera dimensión (BN-PAGE) y desnaturalizantes en la segunda (SDS-PAGE).

#### 3.1 Análisis de la primera dimensión: BN-PAGE.

Los resultados obtenidos al someter a análisis electroforético mediante BN-PAGE a OMVs de las cepas de *N. meningitidis* y *N. lactamica* utilizadas en el estudio (**tabla 11**) se muestran en la **figura 45**.



**Figura 45:** Análisis por BN-PAGE de complejos proteicos de membrana externa de las cepas de *Neisseria meningitidis* 2851 y sus mutantes en PorA, PorB, RmpM y FetA; 3059 y sus mutantes en PorA y PorB; *N. meningitidis* B16B6, M982 y Nm30 y de las cepas de *N. lactamica* NIP0, NIP2 y NIP5. A la derecha se indica el Pm de algunos de los complejos más significativos.

Se observa la presencia de tres complejos de alto peso molecular (700, 550 y 480 kDa) que aparecen en todas las cepas excepto M982 (carece del complejo de 700 kDa) y NIP5, en la que no se detecta el complejo de 480 Kda. También aparecen una serie de complejos cuyo Pm varía entre 200 y 150 kDa en la cepa 2851 y en sus mutantes, en todas las cepas de *N. lactamica* y en la cepa *N. meningitidis* 3059. En las cepas B16B6, Nm30 y M982, el Pm de estos complejos es mayor, situándose entre 315 y 220 kDa.

En la cepa 2851 y sus mutantes se observa la presencia de una banda de 360 kDa común a todas ellas, así como la de otra de 663 kDa que sólo aparece en la cepa que carece de la proteína RmpM (2851 RmpM-). Si comparamos la movilidad electroforética de los complejos de Pm comprendido entre 200 y 150 kDa en los distintos mutantes respecto a la de la cepa salvaje, se observan variaciones que evidencian la participación en su composición de las proteínas en las que éstos son defectivas.

En el caso de la cepa 3059 y sus dos mutantes “knock-out”, se puede observar que la mayor parte de los complejos presentes en la cepa salvaje entre 200 y 150 kDa ven modificada su movilidad en el gel al eliminar las proteínas PorA o PorB.

### 3.2 Análisis de la segunda dimensión: SDS-PAGE.

Con el fin de estudiar la composición de los complejos separados en la primera dimensión, se realizó una segunda electroforesis en condiciones desnaturizantes con SDS y tratamiento de la muestra a 95°C.

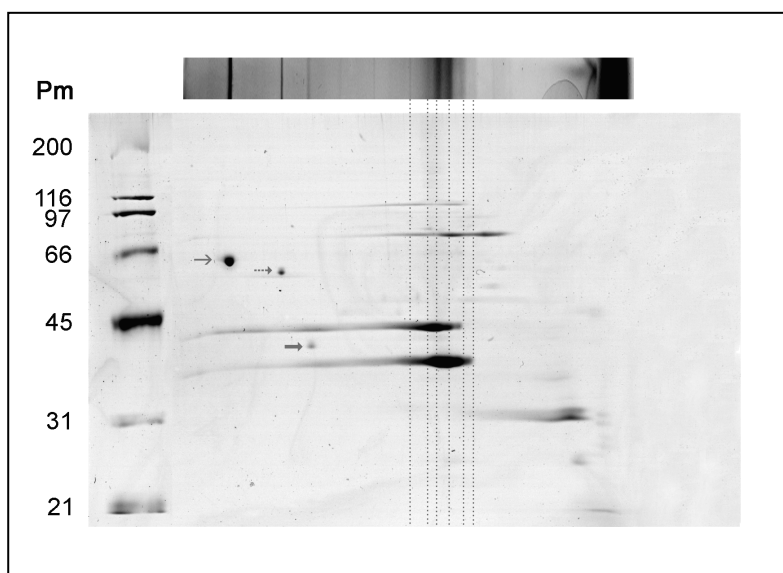
Al comparar las imágenes se observa que en todas las cepas de *N. meningitidis* los complejos de 700 y 550 kDa son homoméricos y están

constituidos por proteínas cuyos pesos moleculares son 64 (→) y 60 (↔) kDa. El análisis de las OMVs de la cepa 2851 mediante MALDI-TOF (apartado 3.3) permitió identificar a estas proteínas como la chaperonina de 60 kDa y glutamato-sintetasa respectivamente. El complejo de 480 kDa también es homomérico en la cepa 2851 y sus mutantes (**figuras 46 y 47**) y está formado por una proteína de 41 kDa identificada como cetoácido reductoisomerasa (→). En el resto de cepas de *N. meningitidis* (**figuras 48–52**) esta proteína está acompañada por otra de 38 kDa (→) que no pudo ser identificada. En el caso de las tres cepas de *N. lactamica* (**figuras 53–55**), los complejos de alto peso molecular tienen la misma composición que en *N. meningitidis* y aparece además un nuevo complejo a de unos 420 kDa de Pm observable en la primera dimensión.

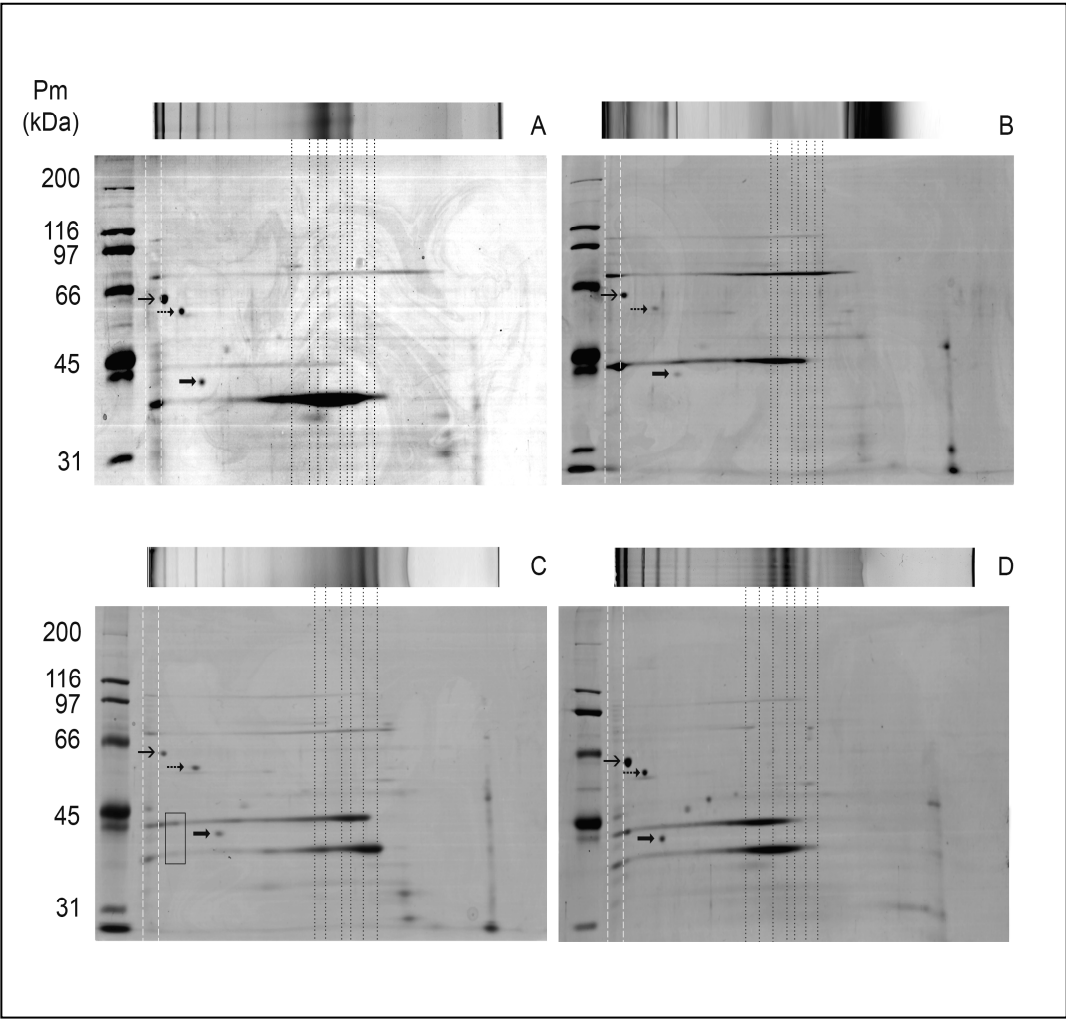
Al comparar las cepas mutantes que carecen de PorA (**figuras 47 A y 49 A**) o PorB (**figuras 47 B y 49 B**) se observa que en todas ellas las porinas y la FetA tienden a acumularse por encima del complejo de 700 kDa en mayor cantidad que en la cepa salvaje, lo que indica la existencia de una asociación entre dichas proteínas. Este desplazamiento es menos evidente en los mutantes de la cepa 3059 debido muy probablemente a una menor eficiencia del proceso de extracción. Los complejos de movilidad electroforética variable presentes en cualquiera de estos mutantes tienen un peso molecular inferior al de los de la cepa salvaje correspondiente.

En la cepa 2851 RmpM- (**figura 47 C**) también se observa la acumulación de las porinas y FetA por encima de los 700 kDa y la aparición de un nuevo complejo de alto peso molecular (en torno a 660 kDa) formado por PorA y PorB (recuadrado en la figura). También se observa una disminución en la movilidad de los complejos electroforéticos de movilidad variable.

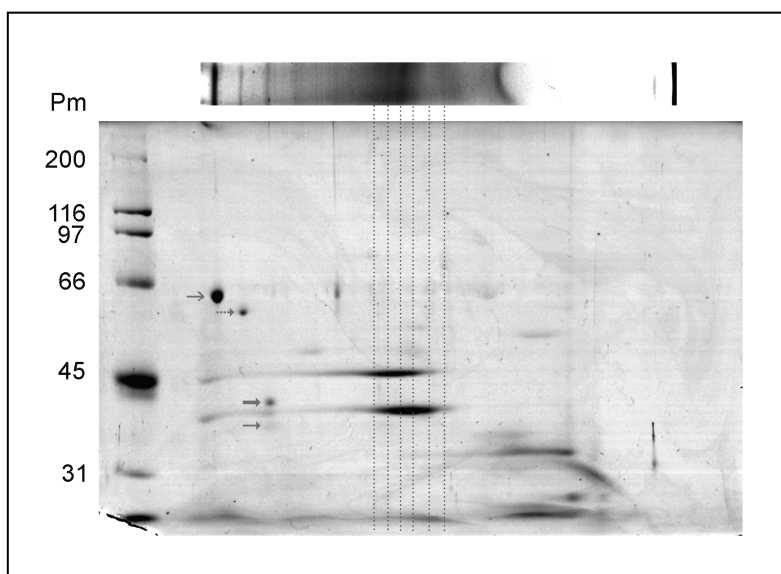
La cepa mutante FetA-, 3043 (**figura 47 D**) presenta un perfil similar al de la cepa salvaje 2851, si bien hay que destacar que al igual que en el resto de los mutantes analizados, las porinas y la RmpM tienden a acumularse por encima del complejo de 700 kDa.



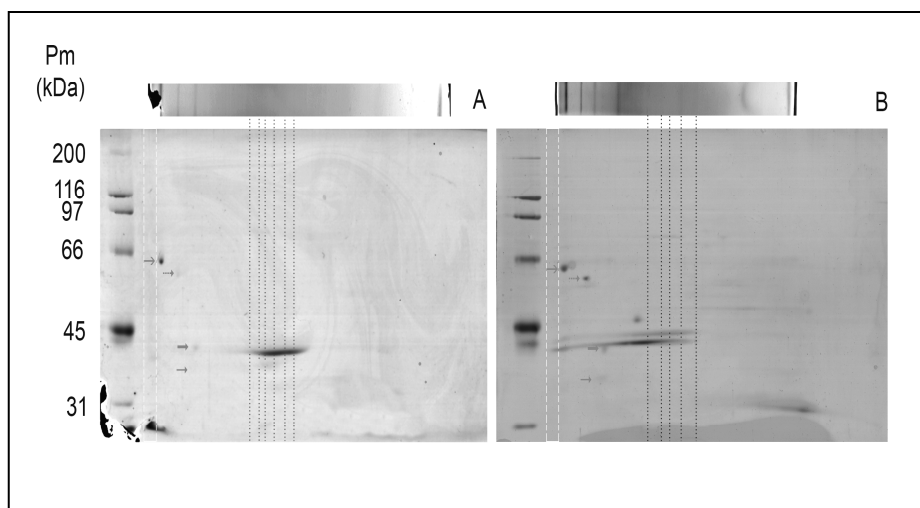
**Figura 46:** Electroforesis 2D en BN/SDS-PAGE de OMVs de la cepa *N. meningitidis* 2851. Los complejos de movilidad variable se señalan con líneas punteadas.



**Figura 47:** Electroforesis 2D en BN/SDS-PAGE de OMVs de las cepas mutantes Knock-out de *N. meningitidis* 2851 (A) *N. meningitidis* 3050 (mutante PorA-); (B) *N. meningitidis* 3103 (mutante PorB-); (C) *N. meningitidis* 2851 RmpM- y (D) *N. meningitidis* 3043 (mutante FetA-). Las líneas discontinuas señalan la acumulación de proteínas por encima de 700 kDa; los complejos de movilidad variable se señalan con líneas punteadas.

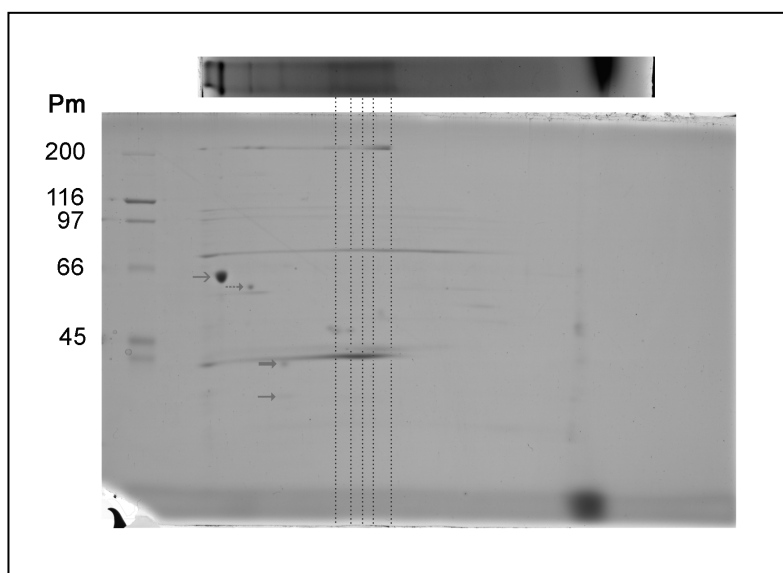


**Figura 48:** Electroforesis 2D en BN/SDS-PAGE de OMVs de la cepa *N. meningitidis* 3059. Los complejos de movilidad variable se señalan con líneas punteadas.



**Figura 49:** Electroforesis 2D en BN/SDS-PAGE de OMVs de las cepas mutantes Knock-out de *N. meningitidis* 3059 (A) *N. meningitidis* 3091 (mutante PorA-); (B) *N. meningitidis* 3094 (mutante PorB-). Las líneas discontinuas señalan la acumulación de proteínas por encima de 700 kDa; los complejos de movilidad variable se señalan con líneas punteadas.

Las cepas de *N. meningitidis* B16B6, M982 y Nm30 (**figuras 50 a 52**) muestran una menor cantidad de proteínas que el resto de cepas analizadas. Las proteínas PorA y PorB forman líneas mucho más tenues y el peso molecular de la PorB es mayor que en las cepas 2851 y 3059 (43kDa). Los complejos de los que forman parte ambas proteínas se localizan a pesos moleculares también mayores (entre 315 y 220 kDa).



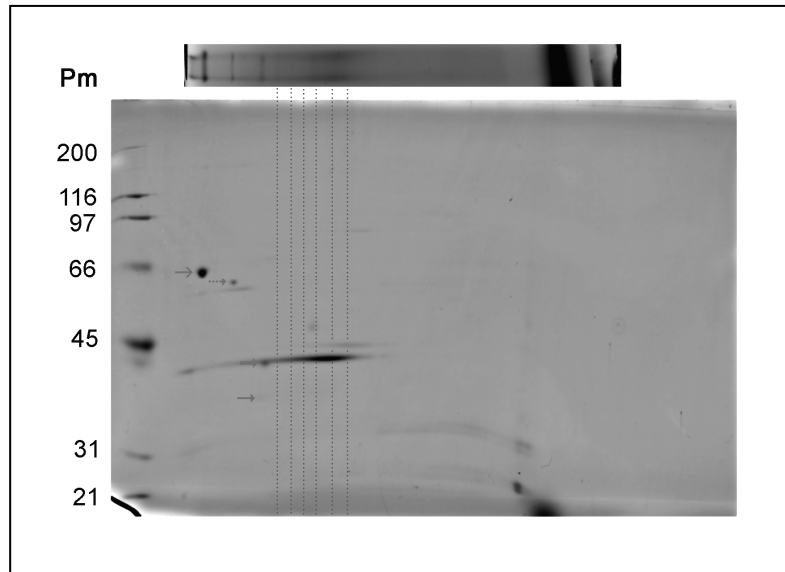
**Figura 50:** Electroforesis 2D en BN/SDS-PAGE de OMVs de la cepa *N. meningitidis* B16B6. Los complejos de movilidad variable se señalan con líneas punteadas.

En el caso de la cepa *N. meningitidis* Nm30 (**figura 51**), los complejos de movilidad variable compuestos por las dos porinas se sitúan a pesos moleculares comprendidos entre 300 y 230 kDa (300, 266 y 229 kDa).

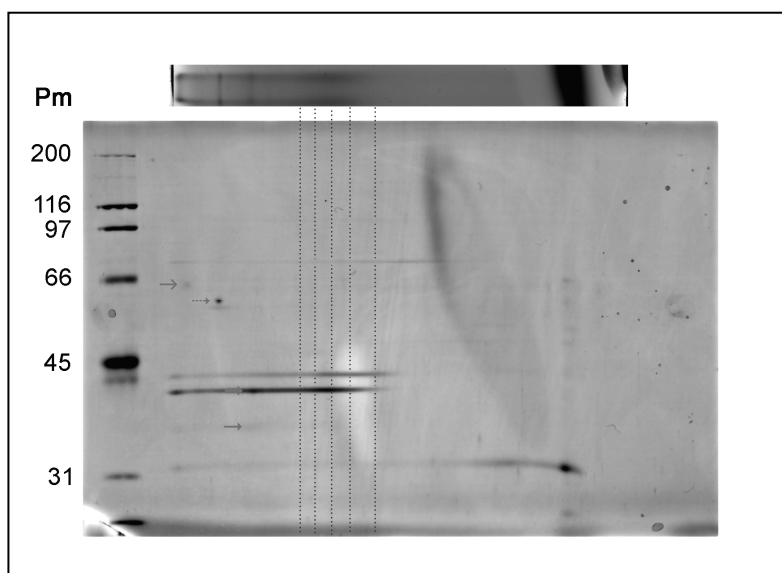
En la cepa M982 (**figura 52**) el complejo de la chaperonina de 700 kDa apenas es visible. El complejo de 480 kDa está formado por la cetoácido reductoisomerasa y una proteína de 38 kDa. Los complejos de



movilidad variable en este caso se localizan entre 310 y 231 kDa y están constituídos por PorA y PorB o, en el caso del de menor Pm, por PorA y FetA.

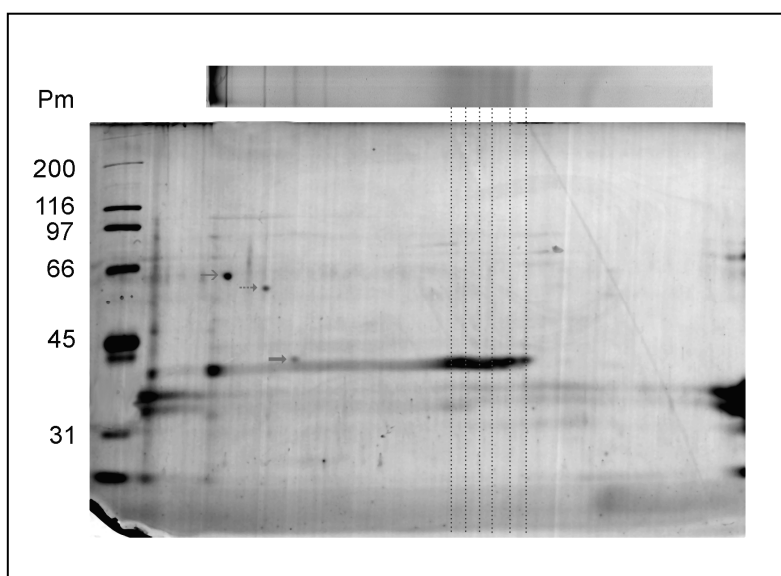


**Figura 51:** Electroforesis 2D en BN/SDS-PAGE de OMVs de la cepa *N. meningitidis* Nm30. los complejos de movilidad variable se señalan con líneas punteadas.

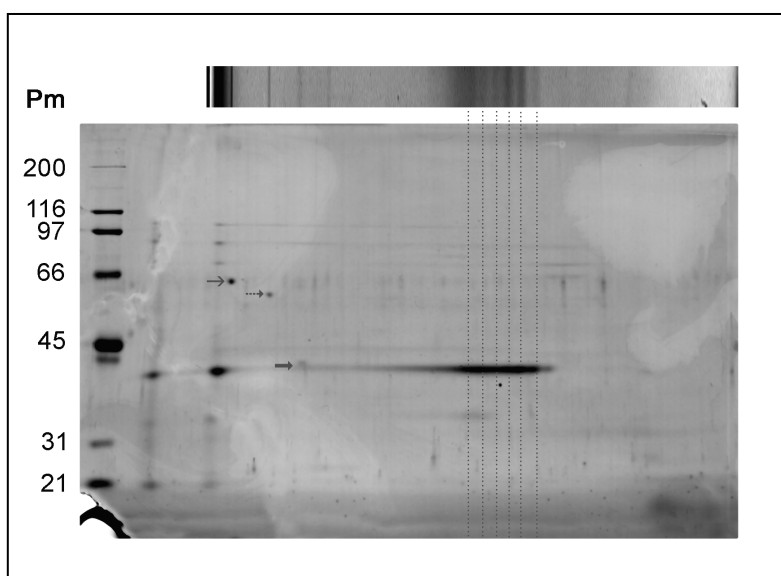


**Figura 52:** Electroforesis 2D en BN/SDS-PAGE de OMVs de la cepa *N. meningitidis* M982. Los complejos de movilidad variable se señalan con líneas punteadas.

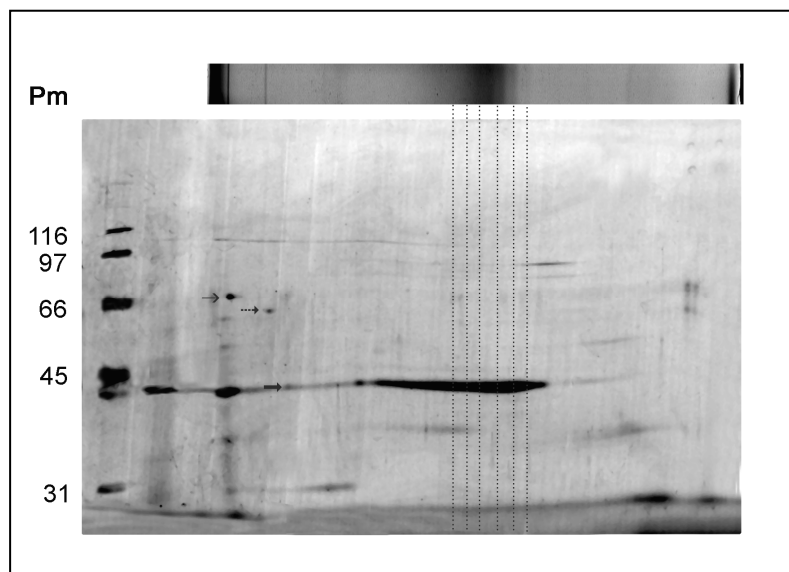
Las cepas de *N. lactamica* son muy similares entre sí (**figuras 53 a 55**). En todas ellas se pueden observar en la segunda dimensión los tres complejos de alto peso molecular con la misma composición que los presentes en *N. meningitidis* y uno de 420 kDa específico de esta especie. En lo que respecta a los complejos de movilidad electroforética variable, son 5, de pesos moleculares comprendidos entre 200 y 150 kDa, los dos primeros formados por las proteínas PorB (de 30 kDa) y otra de 25 kDa y el resto sólo por PorB, al igual que ocurría en las cepas mutantes de *N. meningitidis*.



**Figura 53:** Electroforesis 2D en BN/SDS-PAGE de OMVs de la cepa *N. lactamica* NIP0. los complejos de movilidad variable se señalan con líneas punteadas.



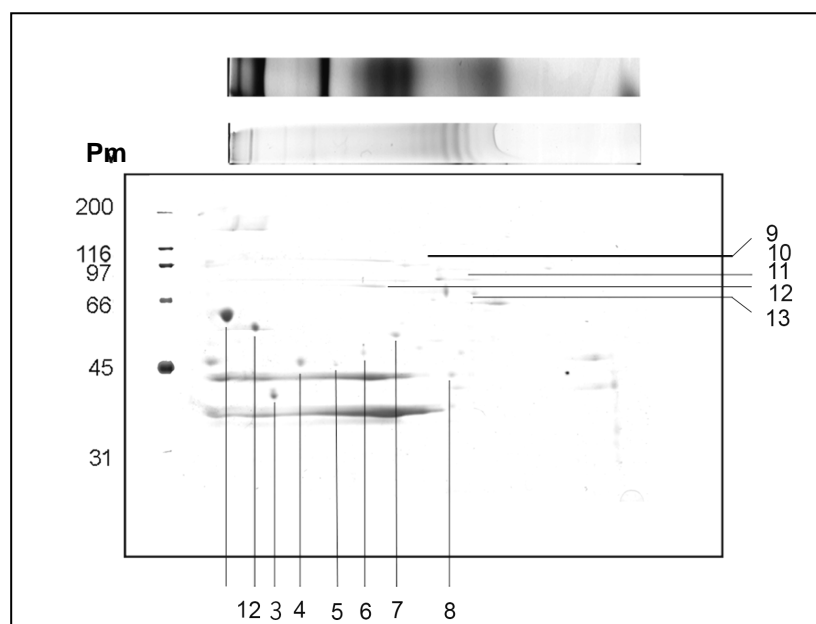
**Figura 54:** Electroforesis 2D en BN/SDS-PAGE de OMVs de la cepa *N. lactamica* NIP2. los complejos de movilidad variable se señalan con líneas punteadas.



**Figura 55:** Electroforesis 2D en BN/SDS-PAGE de OMVs de la cepa *N. lactamica* NIP5. los complejos de movilidad variable se señalan con líneas punteadas.

### 3.3 Identificación por MALDI-TOF.

Algunas de las proteínas fueron identificadas mediante análisis por MALDI-TOF de OMVs de la cepa *N.meningitidis* 2851 extraídas con DOC (**figura 56, tabla 12**).



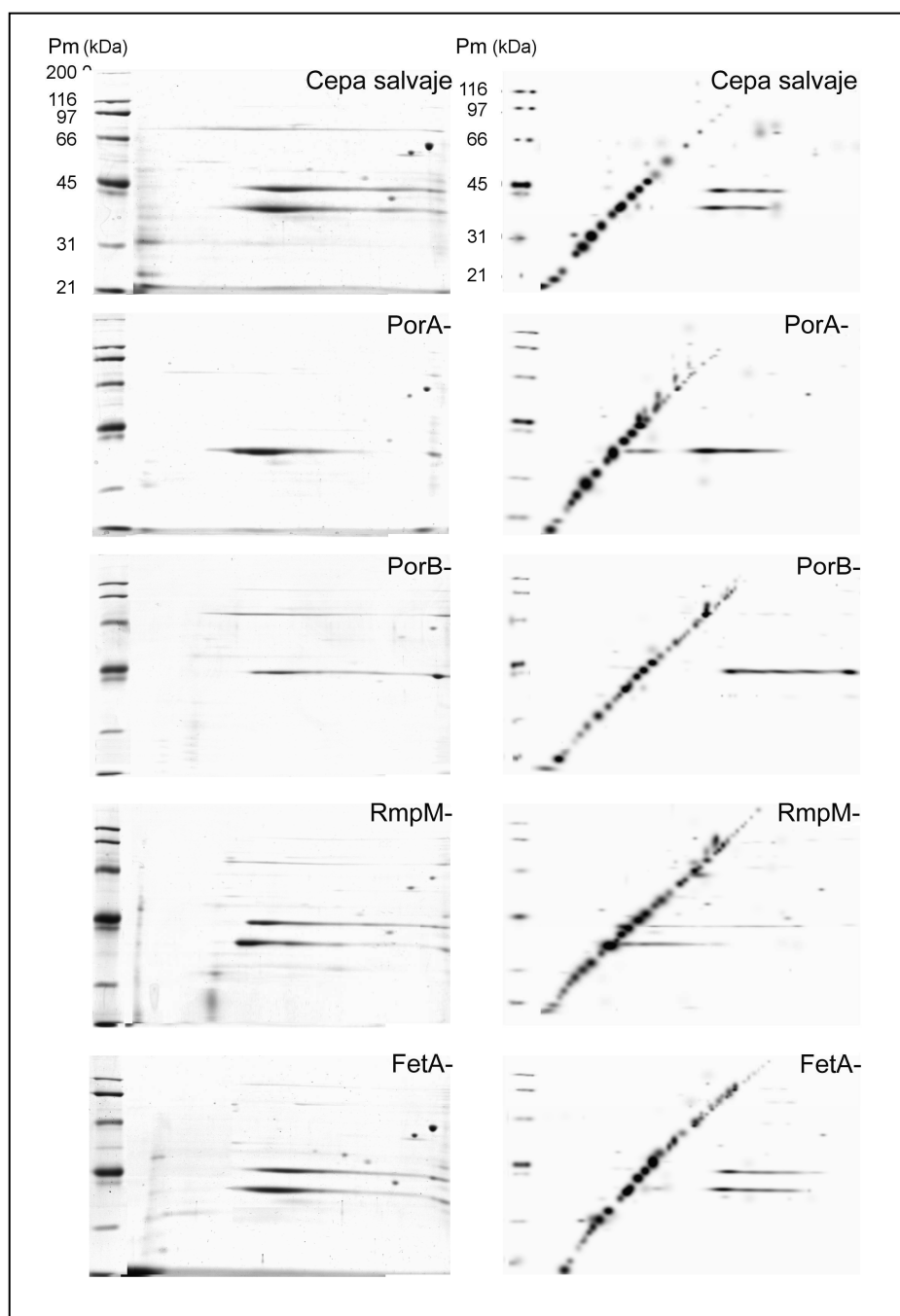
**Figura 56:** Proteínas identificadas por MALDI-TOF en una electroforesis bidimensional en BN/SDS-PAGE realizada con OMVs de la cepa 2851

**Tabla 12:** Resultados obtenidos para la búsqueda en MASCOT tras el análisis de OMVs de la cepa *N. meningitidis* 2851.

Punto	Identificación	Accesion	Pm (kDa)	Score	Nº péptidos
1	Chaperonina, 60 kDa	11277963	57,501	126	13
2	Glutamato sintetasa	11272158	52,275	136	13
3	Cetoácido reductoisomerasa	11251576	36,529	157	16
4	glutamato deshidrogenasa NADP dependiente	11252788	48,745	191	26
5	glutamato deshidrogenasa NADP dependiente	11252786	46,514	112	12
6	leucina aminopeptidasa	11264564	50,341	77	8
7	Aldehído deshidrogenasa A	11251937	52,509	98	17
8	Polirribonucleótido Nucleotidiltransferasa	11279140	76,488	123	18
9	Pyruvato deshidrogenasa	Q9JZ12	98,899	227	28
10	Proteína de unión a transferrina A	321737	102,746	139	17
11	Maltosa fosforilasa	Q9K109	85,607	104	14
12	proteina regulada por Hierro B	2120893	79,563	288	27
13	P64K	CAA01331	63,140	198	18

### 3.4 Comparación de las técnicas 2D BN/SDS-PAGE y 2D dSDS-PAGE para el análisis de complejos de membrana externa de *N. meningitidis*.

En la **figura 57** se comparan los resultados obtenidos al analizar la cepa 2851 y sus mutantes para las proteínas PorA, PorB, RmpM y FetA mediante electroforesis 2D BN/SDS-PAGE y electroforesis 2D dSDS-PAGE. En ella se puede observar que los resultados obtenidos utilizando ambas técnicas son similares, de modo que la composición de los complejos de porinas en cada cepa es la misma cuando se analizan por cada uno de estos métodos. El desplazamiento de los complejos de porinas en la cepa RmpM- hacia regiones de menor peso molecular que en la cepa salvaje correspondiente es evidente utilizando cualquiera de los dos métodos. En las muestras analizadas en condiciones nativas aparecen una serie de complejos que no están presentes cuando se utiliza dSDS-PAGE, los complejos de 700, 550 y 480 kDa, todos ellos homocomplejos constituidos por las proteínas chaperonina de 60 kDa, glutamato-sintetasa y cetoácido reductoisomerasa respectivamente y que corresponderían a interacciones más débiles que se rompen al someter a las muestras al tratamiento previo a la segunda dimensión de la dSDS-PAGE



**Figura 57:** Comparación de los resultados obtenidos al analizar la cepa 2851 y sus mutantes para las proteínas PorA, PorB, RmpM y FetA mediante electroforesis bidimensional BN/SDS-PAGE (izquierda) y electroforesis bidimensional diagonal (derecha).



#### 4. Discusión.

En el presente capítulo se ha utilizado la electroforesis bidimensional blue-native (2D BN/SDS-PAGE) para analizar el complexoma de cepas patógenas de *N. meningitidis* y de la especie comensal *N. lactamica*. Del mismo modo, se ha estudiado el proteoma de membrana externa de una serie de mutantes “knock-out” de *N. meningitidis* con el fin de determinar la influencia de la ausencia de determinadas proteínas en la composición de los complejos de proteínas de membrana externa de las mismas.

El análisis por BN-PAGE revela la existencia de tres complejos proteicos de alto peso molecular (480, 550 y 700 kDa) y de una serie de complejos cuya movilidad electroforética varía en las distintas cepas, situados entre 150 y 200 kDa. El análisis mediante espectrometría de masas de los puntos separados tras realizar una segunda dimensión en condiciones desnaturalizantes indica una composición homomérica de los tres complejos de mayor peso molecular, que están formados respectivamente por las proteínas chaperonina de 60 kDa, glutamato sintetasa y cetoácido reductoisomerasa, todas ellas catalogadas como proteínas de localización citoplasmática según las bases de datos disponibles. Cabe destacar que tanto la presencia de estos complejos como su composición son una constante en todas las cepas de las dos especies estudiadas. Estas tres proteínas han sido descritas como proteínas que se asocian formando oligómeros que, en el caso de la chaperonina (complejo de 700 kDa), ha sido caracterizado por Arakere y col.<sup>206</sup> como un oligómero constituido por dos anillos superpuestos de siete subunidades cada uno, aunque en algunos organismos el número de subunidades puede ser diferente. Un ejemplo es la chaperonina Skp de

*E. coli*, descrita por Qu y col.<sup>248</sup>, que forma complejos triméricos y que, además, se asocia con proteínas de la membrana externa de esta bacteria. La observación en el citado estudio de complejos de chaperoninas en dicha membrana estaría, por tanto, de acuerdo con nuestros datos y no carece de sentido si consideramos que las proteínas de membrana externa también sufren el tipo de procesos de reconformación para los que las chaperoninas parecen ser mediadores universales.<sup>249</sup>

En el caso del complejo de la glutamato sintetasa (550 kDa), Yamashita y col.<sup>250</sup> han descrito un modelo consistente en oligómeros de 12 subunidades organizadas en dos anillos de 6 subunidades cada uno. Con respecto al complejo de cetoácido reductoisomerasa (480 kDa), ha sido descrito en *Pseudomonas aeruginosa* por Ahn y col.<sup>251</sup> como oligómeros de 12 subunidades formados por seis dímeros asociados. Los pesos moleculares calculados para estos complejos en *N. meningitidis*, en principio, concuerdan con las estructuras descritas en los casos citados anteriormente, aunque la presencia de los complejos de 550 y 480 kDa en las vesículas de membrana no es compatible con su localización descrita en el citoplasma ni acorde con sus respectivas funciones.

---

<sup>248</sup> **Qu J, Mayer C, Behrens S, Holst O, Kleinschmidt JH.** The trimeric periplasmic chaperone Skp of *Escherichia coli* forms 1:1 complexes with outer membrane proteins via hydrophobic and electrostatic interactions. *J Mol Biol.* 2007; 374: 91–105.

<sup>249</sup> **Horwich AL, Fenton WA, Chapman E, Farr GW.** Two families of chaperonin: physiology and mechanism. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2007; 23:115–145.

<sup>250</sup> **Yamashita MM, Almassy RJ, Janson CA, Cascio D, Eisenberg D.** Refined atomic model of glutamine synthetase at 3.5 Å resolution. *J Biol Chem.* 1989; 264: 17681–17690.

<sup>251</sup> **Ahn HJ, Eom SJ, Yoon HJ, Lee BI, Cho H, Suh SW.** Crystal structure of class I acetohydroxy acid isomeroreductase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Mol Biol.* 2003; 328: 505–515.

En todas las cepas estudiadas existen una serie de complejos situados entre 150 y 200 kDa que, al contrario de los descritos anteriormente, sí muestran diferencias en su movilidad electroforética tanto entre las cepas de *N. meningitidis* y *N. lactamica* como en los distintos mutantes de *N. meningitidis* respecto a la cepa salvaje correspondiente. Estas diferencias evidencian la participación en su composición de las proteínas en las que cada una de las cepas es defectiva. Estos complejos estarían constituidos por asociaciones variables entre las porinas PorA y PorB y otras proteínas como la RmpM o la FetA y formarían parte del entramado de poros utilizado por la bacteria para el transporte. La comparación de los patrones de 1D BN-PAGE y 2D BN/SDS-PAGE de los mutantes “knock-out” respecto a la cepa salvaje, sugiere que la proteína realmente importante en la estructura y función de estos poros es la PorB, ya que en ausencia de la PorA, los complejos correspondientes a homómeros de PorB, mantienen su posición e incrementan su densidad. Además, la tasa de crecimiento de las cepas en las que la única porina presente es la PorB no se ve alterada. Sin embargo, en ausencia de la PorB se desestabiliza toda la estructura de poros observable en la cepa salvaje, desapareciendo casi todos los complejos de movilidad variable y apareciendo un supercomplejo de muy alto peso molecular formado por la PorA.

El hecho de que se observen alteraciones en los patrones de bandas de porinas en el mutante RmpM-, sugiere que esta proteína también es importante en la estabilidad de, al menos, algunos de estos complejos. Este hecho se observa también muy claramente en los análisis por electroforesis diagonal de este mutante (ver *Capítulo II*), en el que

todos los complejos de porinas se encuentran claramente desplazados hacia regiones de menor peso molecular que en la cepa salvaje correspondiente.

Nuestros resultados sugieren que las proteínas PorA y PorB constituirían el sistema básico de transporte en la membrana externa de *N. meningitidis*, que se complementaría por la unión transitoria de proteínas como la RmpM u otras en función de las necesidades de transporte específicas en cada momento del ciclo celular de estas bacterias, lo que justificaría la aparición de múltiples bandas conteniendo PorA y PorB. Los datos indican también que probablemente la PorB se sintetiza en mayor cantidad que la PorA, como indica el hecho de que se observen complejos formados exclusivamente por PorB.

Para concluir, sugerimos por tanto que las dos porinas de *N. meningitidis* podrían constituir un entramado dinámico de poros cuya composición sería variable a lo largo del tiempo y en función de las necesidades de las bacterias.

**Sinopsis.**



El análisis de las proteínas de membrana es un proceso dificultoso, puesto que en general son altamente hidrofóbicas, con una o varias regiones transmembrana o estrechamente asociadas a la membrana y en su forma funcional, muchas de ellas constituyen complejos formados por múltiples subunidades. Estos complejos pueden contener cofactores y lípidos y, en algunos casos, proteínas periféricas que son funcionalmente importantes, pero que se separan fácilmente durante el proceso de aislamiento.

La separación analítica de las proteínas de membrana externa es esencial para la identificación de candidatos adecuados para el desarrollo de vacunas pero hay que tener en cuenta que en muchos casos la inmunogenicidad de las proteínas dependerá de que éstas se presenten en su forma nativa, lo que hace necesaria la utilización de métodos no desnaturizantes como la electroforesis “blue-native” (BN-PAGE).<sup>217</sup> El análisis de las subunidades de un complejo de membrana aislado es necesario para determinar la función del mismo. Para este objetivo analítico se utilizan frecuentemente la electroforesis monodimensional en geles de poliacrilamida conteniendo dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)<sup>189</sup> y/o la electroforesis bidimensional en conjunción con isoelectroenfoque (IEF/SDS-PAGE).<sup>167</sup>

Independientemente del método que se utilice, el primer paso necesario es el enriquecimiento de la muestra ya que las proteínas de membrana constituyen una parte reducida del proteoma de la célula y debido a ello no pueden ser analizadas fácilmente mediante métodos que consideren el total de proteínas presentes en la misma. La capacidad de *N. meningitidis* de producir OMVs constituidas principalmente por

membrana externa facilita la obtención de una muestra rica en proteínas de la misma.

Otro paso previo común a todos los métodos de separación es conseguir una buena solubilización. El éxito de esta fase radica no sólo en el tipo de detergente utilizado, sino también en su concentración, siendo especialmente importante en aquellos casos en los que se pretende purificar los complejos de proteínas de membrana de forma intacta. La elección del detergente en cada caso continúa siendo problemática, si bien en los últimos años se han realizado importantes avances en este campo.<sup>252,253</sup> En los casos en los que se trabaja con complejos proteicos, la presencia de detergentes va a ser necesaria también tras los procesos de solubilización y separación para mantener intacta su estructura.

En nuestro estudio hemos evaluado la utilidad de tres técnicas electroforéticas bidimensionales diferentes para la evaluación del proteoma y complexoma de membrana externa de *Neisseria*. Cada una de ellas presenta ventajas e inconvenientes y nos permite analizar distintos aspectos de los mismos. En primer lugar, hemos realizado un análisis mediante IEF/SDS-PAGE, pues numerosos estudios anteriores<sup>192,193</sup> aseguraban que debido a su buena resolución en la separación de proteínas resultaba adecuado tanto para la elaboración de mapas proteicos de referencia como para la identificación y caracterización antigénica de todas las proteínas, preferentemente solubles, presentes en una muestra dada convirtiéndolo en el método de elección utilizado hasta la fecha para la elaboración de mapas proteicos de referencia. Hemos analizado la

---

<sup>252</sup> **Garavito RM, Ferguson-Miller S.** Detergents as tools in membrane biochemistry. *J Biol Chem.* 2001; 276: 32403–32406.

<sup>253</sup> **Kashino Y.** Separation methods in the analysis of protein membrane complexes. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2003; 797: 191–216.



adecuación de esta técnica para el análisis de proteínas de membrana externa de *N. meningitidis* y *N. lactamica*. Nuestros resultados nos han permitido detectar la presencia de numerosas proteínas y varios antígenos compartidos por ambas especies, si bien hay que resaltar que la variabilidad intraespecífica observada es de una magnitud similar a la interespecífica y que el análisis bioinformático de los mapas proteicos no detecta la presencia de ciertas proteínas identificadas como iguales cuando se utiliza MALDI-TOF. Las proteínas PorA y RmpM, dos de los antígenos de membrana externa más relevantes, se manifiestan como varios puntos situados en diferentes posiciones que reflejan la existencia de variabilidad tanto en Pm como en pI. Algunos de estos puntos son comunes a todas las especies analizadas y otros específicos de *N. meningitidis*. Como ya hemos mencionado en el capítulo I, en el caso de la proteína PorA, la variabilidad puede deberse a modificaciones y/o procesamiento postranslacional<sup>184,193</sup> o bien a la asociación de esta porina con distintos complejos de membrana de pI variable<sup>195</sup> que no se resuelven durante la primera dimensión de la electroforesis. En el caso de la RmpM, uno de los puntos específicos de *N. meningitidis*, de Pm 19 kDa, podría corresponder al fragmento C-terminal de la proteína.<sup>196</sup> Este tipo de resultados dificultan el análisis de las imágenes basado exclusivamente en la posición de los puntos en los mapas proteómicos o inmunoproteómicos, que debido a ello no constituye un método fiable para la predicción de la identidad de las proteínas o antígenos, siendo necesaria su combinación con otras técnicas, como la identificación mediante MALDI-TOF, para comparaciones adecuadas. Otra desventaja de este método radica en su complejidad, que lo convierte en muy dificultoso cuando se utiliza a pequeña escala y muy susceptible al proceso de manipulación de muestras. Además esta técnica impide el análisis de proteínas de pI extremos o de aquellas que no se solubilizan durante el proceso de IEF y presenta

dificultades a la hora de detectar proteínas minoritarias. Como las condiciones utilizadas para la solubilización de la muestra son muy fuertes, las proteínas analizadas de este modo se encuentran en conformaciones que difieren de la nativa, lo que puede constituir un problema a la hora de estudiar su inmunogenicidad, sobre todo si consideramos que gran parte de las proteínas de membrana van a formar complejos constituidos por varias subunidades,<sup>206-209</sup> llevando a la obtención de resultados anómalos en los patrones antigénicos obtenidos tras el análisis por Western-blotting.

El estudio de las relaciones existentes entre las distintas proteínas es importante desde el punto de vista inmunológico, pues su unión puede determinar la formación de epitopos conformacionales o compartidos.<sup>204,205</sup> La dSDS-PAGE utilizando diferentes tratamientos en cada dimensión ha demostrado ser un método rápido, simple y fiable tanto para la detección de complejos multiproteicos, como para estudiar la disociación inducida por temperatura de proteínas o los cambios conformacionales debidos a la misma. En nuestro caso, este método nos ha permitido demostrar que, contrariamente a lo establecido hasta el momento,<sup>211</sup> la mayor parte de los complejos de porinas de membrana de *N. meningitidis* son heterómeros de las porinas PorA/PorB asociadas a la proteína RmpM, no existiendo evidencia de la presencia de complejos homoméricos de las porinas PorA o PorB en ninguna de las cepas salvajes analizadas, si bien resulta evidente la presencia de los mismos en las cepas mutantes carentes de alguna de las porinas. La dSDS-PAGE también nos permite confirmar que en *N. lactamica* los poros de membrana están constituidos por homómeros de la porina PorB<sup>106</sup> asociada a la RmpM,<sup>120</sup> así como obtener una buena resolución de las Opa<sup>215</sup> y la evidencia de la

presencia de otras proteínas con movilidad dependiente de temperatura,<sup>214</sup> difíciles de detectar mediante otras técnicas.

A pesar de su utilidad, la electroforesis bidimensional dSDS-PAGE es una técnica desnaturalizante, de modo que no permitirá el estudio de aquellas asociaciones de proteínas susceptibles a la desnaturalización por SDS, como es el caso de los homocomplejos de PorB,<sup>212</sup> que se disgregan incluso a muy baja temperatura y que aún estando presentes en la membrana externa, no aparecerían en este tipo de análisis.

El análisis mediante 2D BN/SDS-PAGE permite determinar la composición de los complejos de membrana en condiciones nativas, pues se trata de un sistema electroforético no desnaturalizante,<sup>217,218</sup> que posibilita el estudio de interacciones débiles que no aparecen representadas en los geles dSDS-PAGE, y también el estudio funcional de los complejos una vez separados.<sup>223,224</sup> Con esta técnica hemos detectado la presencia de tres complejos homoméricos de alto peso molecular no detectables mediante dSDS-PAGE, que están presentes en todas las cepas analizadas y constituidos respectivamente por las proteínas chaperonina de 60kDa, glutamato sintetasa y cetoácido reductoisomerasa. También hemos confirmado que la composición heteromérica de los poros de membrana se observa *in vivo*, y hemos determinado la unión transitoria de proteínas como la RmpM u otras a estos complejos en función de las necesidades de transporte específicas en distintos momentos del ciclo celular de estas bacterias. La PorB es la proteína más importante tanto estructural como funcionalmente, pues cuando está ausente los poros se desestabilizan, lo que no ocurre cuando falta la PorA. La ausencia de la RmpM provoca un desplazamiento de los poros hacia regiones de menor peso molecular, que

también se detecta en dSDS-PAGE, y evidencia su participación en la estructura de los mismos.

Los principales problemas que nos encontramos al aplicar esta técnica son la dificultad para la estimación adecuada del peso molecular de los complejos,<sup>219</sup> que va a impedir determinar de forma correcta la estequiometría de los mismos, y la posible existencia de complejos extremadamente lábiles que se disocian en presencia de CBB,<sup>221</sup> lo que impediría su detección en los geles.

Los resultados obtenidos aplicando las técnicas de dSDS-PAGE y 2D BN/SDS-PAGE son, por tanto, complementarios y proporcionan una visión global del proteoma de membrana de *Neisseria* que permite sugerir que las dos porinas de *N. meningitidis* podrían constituir un entramado dinámico de poros cuya composición sería variable a lo largo del tiempo y en función de las necesidades de las bacterias.

## **Conclusiones**



1. La electroforesis 2D IEF/SDS-PAGE excluye del análisis proteico de la membrana externa de *Neisseria*, proteínas de alto peso molecular, fuertemente hidrofóbicas, con *pI* extremos, o aquellas con tendencia a formar complejos. Además, en el caso de algunas proteínas mayoritarias, la técnica detecta numerosas isoformas que en realidad son artefactos lo que nos lleva a concluir que no es la más adecuada para el estudio de la membrana externa, si bien los mapas proteicos de *Neisseria lactamica* y *Neisseria meningitidis* obtenidos, nos permiten establecer que existe un grado de similitud entre ambas especies comparable al observado entre cepas de *Neisseria meningitidis*.
2. Tanto la electroforesis 2D dSDS/SDS-PAGE como la 2D BN/SDS-PAGE han resultado ser técnicas muy útiles y sencillas para la detección y análisis de complejos de proteínas de membrana externa. Además, la primera de ellas permite una óptima detección y resolución de proteínas con movilidad dependiente de la temperatura como es el caso de las proteínas de opacidad (Opa) de *Neisseria*.
3. En desacuerdo con la estructura homomérica propuesta para los poros de *Neisseria meningitidis*, los resultados de las electroforesis 2D dSDS/SDS-PAGE y BN/SDS-PAGE permiten concluir que los complejos de porinas meningocócicas de membrana externa presentes en condiciones naturales en las cepas salvajes de esta especie están formados por heterómeros de PorA y PorB y, en menor cantidad, por homómeros de PorB. Las asociaciones homoméricas de PorA únicamente se detectan en las cepas mutantes carentes de PorB.

4. La comparación de los patrones tanto de la 1D BN-PAGE como de la 2D BN/SDS-PAGE obtenidos con los mutantes “knock-out” con respecto a los obtenidos con la cepa salvaje, revela que la proteína realmente importante en la estructura y función de estos poros es la PorB, cuya ausencia desestabiliza toda la estructura de poros observable en la cepa salvaje.

Finalmente, postulamos que el sistema básico de transporte de *Neisseria meningitidis* estaría constituido por poros mixtos de PorA/PorB y cuyo funcionamiento estaría complementado por la unión transitoria de distintas proteínas, entre ellas la RmpM, en función de las necesidades de transporte específicas de cada momento del ciclo celular. Por tanto, las dos porinas de *Neisseria meningitidis* podrían constituir un entramado dinámico de poros cuya composición sería variable a lo largo del tiempo y en función de las necesidades de las bacterias.



## **Bibliografía**



- Adhikari P, Berish SA, Nowalk AJ, Veraldi KL, Morse SA, Mietzner TA. *J Bacteriol.* 1996; 178: 2145–2149
- Ahn HJ, Eom SJ, Yoon HJ, Lee BI, Cho H, Suh SW. *J Mol Biol.* 2003; 328: 505–515
- Arakere G, Kessel M, Nguyen N, Frasch CE. *J Bacteriol.* 1993; 175: 3664–3668
- Arumugham R, Fortuna–Nevin M, Mountzouros K. En: *Proceedings of the Fifth Conference of the International Endotoxin Society*. Pág. 52. 1998. Santa Fe. (USA).
- Andersen JS, Wilkinson CJ, Mayor T, Mortensen P, Nigg EA, Mann M. *Nature.* 2003; 426: 570–574
- Aycock WL, Mueller JH. *Bacteriol Rev* 1950; 14: 115–160
- Bartolini A, Norelli F, Ceccarini C, Rappouli R, Constantino P. *Vaccine.* 1995; 13: 463–470
- Bash M C, Lesiak K B, Banks S D, Frasch C E. *Infect Immun.* 1995; 63: 1484–1490
- Belland RJ, Chen T, Swanson T, Fischer SH. *Mol. Microbiol.* 1992; 6: 1729–1737
- Berggård T, Linse S, James P. *Proteomics.* 2007; 7: 2833–2842
- Bjune G, Høiby EA, Grønnesby JK, Arnesen O, Fredriksen JH, Halstensen A, Holten E, Lindbak AK, Nøkleby H, Rosenqvist E, Solverg LK, Closs O, Jan Eng, Oddvar–Frøholm L, Lystad A, Bakketeig LS, Hareide B. *Lancet.* 1991; 338: 1093–1096
- Boisier P, Nicolas P, Djibo S, Taha MK, Jeanne I, Maïnassara HB, Tenebray B, Kairo KK, Giorgini D, Chanteau S. *Clin Infect Dis.* 2007; 44: 657–663
- Blake MS, Gotschlich EC. En: *Bacterial Outer Membranes as Model Systems*. Inouye M (Ed.) Págs. 377–400. 1986. John Wiley. New York.
- Boulton IC, Gray–Owen SD. *Nat Immunol.* 2002; 3: 229–236
- Boulton IC, Yost MK, Anderson JE, Cornelissen CN. 2000; 68: 6988–6996
- Bracegirdle P, Oliver K, Reddin K, Cartwright K, Feavers I, Borrow R, Hudson M, Robinson A, Gorringe A. En: *Proceedings of the 12<sup>th</sup> International Pathogenic Neisseria Conference*. Rice P, Sparling F, Shafer W. (Eds.) Pág. 46. 2000. HCC Inc. Galveston.
- Braun RJ, Kinkl N, Beer M, Ueffing M. *Anal Bioanal Chem.* 2007; 389: 1033–1045
- Bruschi M, Musante L, Candiano G, Ghiggeri GM, Herbert B, Antonucci F, Righetti PG. *Proteomics.* 2003; 3: 821–825
- Bredemeier R, Schlegel T, Ertel F, Vojta A, Borissenko L, Bohnsack MT, Groll M, von Haeseler A, Schleiff E. *J Biol Chem.* 2007; 282: 1882–1890
- Bruge J, Bouveret–Le Cam N, Danve B, Rougon G, Schulz D. *Vaccine.* 2004; 22: 1087–1096

- Buchanan SK, Smith BS, Venkatramani L, Xia D, Esser L, Palnitkar M, Chakraborty R, van der Helm D, Deisenhofer J. *Nat Struct Biol.* 1999; 6: 56–63
- Burré J, Beckhaus T, Schägger H, Corvey C, Hofmann S, Karas M, Zimmerman H, Volkandt W. *Proteomics.* 2006; 6: 6250–6262
- Busnel JM, Varenne A, Descroix S, Peltre G, Gohon Y, Gareil P. *Electrophoresis.* 2005; 26: 3369–3379
- Butland G, Peregrín-Alvarez JM, Li J, Yang W, Yang X, Canadien V, Starostine A, Richards D, Beattie B, Krogan N, Davey M, Parkinson J, Greenblatt J, Emili A. *Nature.* 2005; 433: 531–537
- Cadieux N, Plante M, Rioux CR, Hamel J, Brodeur BR, Martin D. *Infect. Immun.* 1999; 67: 4955–4959
- Cannon JG. *Clin. Microbiol. Rev.* 1989; 2: S1–S4.
- Carbonare SB, Arsianian C, Silva ML, Farhat CK, Carneiro-Sampaio MM. *Pediatr Infect Dis J.* 1995; 14: 797–803
- Cartwright K, Morris R, Rumke H, Fox A, Borrow R, Begg N, Richmond P, Poolman J. *Vaccine.* 1999; 17: 2612–2619
- Claassen I, Meylis J, van der Ley P, Peeters C, Brons H, Robert J, Borsboom D, van der Ark A, van Straaten I, Roholl P, Kuipers B, Poolman J. *Vaccine.* 1996; 14: 1001–1008
- Collins RF, Frye SA, Balasingham S, Ford RC, Tonjum T, Derrick JP. *J Biol Chem.* 2005; 280: 18923–18930
- Connolly M, Noah M. *Epidemiol. Infect.* 1999; 122: 41–49
- Cooper MA. *Anal. Bioanal. Chem.* 2003; 377: 834–842
- Danve B, Lissolo L, Guinet F, Boutry E, Speck D, Cadoz M, Nassif W, Quentin-Millet MJ. En: *Proceedings of the Eleventh International Pathogenic Neisseria Conference.* Nassif X, Quentin-Millet M-J, Taha M-K. (Eds). Pág. 53. 1998. EDK. Paris.
- Danve B, Lissolo L, Mignon M, Dumas P, Colombani S, Schryvers AB, Quentin-Millet MJ. *Vaccine.* 1993; 11: 1214–1220
- de Jonge MI, Hamstra HJ, van Alphen L, Dankert J, van der Ley P. *Mol Microbiol.* 2003; 50:1005–1015
- de Kleijn ED, de Groot R, Lafeber AB, Labadie J, van Limpt KC, Visser J, Berbers GA, van Alphen L, Rümke HC. *Vaccine.* 2000; 19: 1141–1148

- Delepelaire P.** Type I secretion in Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1694: 149–161
- Deng M, Mehta S, Sun F, Chen T.** *Genome Res*. 2002; 12: 1540–1548
- Derrick JP, Urwin R, Suker J, Feavers IM, Maiden MC.** *Infect. Immun*. 1999; 67: 2406–2413
- Devoe IW, Gilchrist JE.** *J. Exp. Med*. 1973; 138: 1156–1167
- Doerrler WT, Raetz CR.** *J Biol Chem*. 2005; 280: 27679–27687
- Dyet K, Devoy A, McDowell R, Martin D.** *Vaccine*. 2005; 23: 2228–2230
- Ellis RJ.** *Trends Biochem Sci*. 2001; 26: 597–604
- Feavers IM, Suker J, McKenna AJ, Heath AB, Maiden MCJ.** *Infect Immun*. 1992; 60: 3620–3629
- Ferrari G, Garaguso I, Adu-Bobie J, Doro F, Taddei AR, Biolchi A, Brunelli B, Giuliani MM, Pizza M, Norais N, Grandi G.** *Proteomics*. 2006; 6: 1856–1866
- Ferreirós CM, Criado MT, Pintor M, Ferrón L.** 1991; 84: 247–254
- Ferrón L, Ferreiraós CM, Criado MT, Pintor M.** *Infect. Immun*. 1992; 60: 2887–2892
- Finne J, Leinonen M, Makela PH.** *Lancet*. 1982; 2: 355–357
- Frasch CE, Peppler MS.** *Infect. Immun*. 1982; 37: 271–280
- Frasch CE, Zollinger WD, Poolman JT.** *Rev Infect Dis*. 1985; 7: 504–510
- Fredriksen JH, Rosenqvist E, Wedege E, Bryn K, Bjune G, Frøholm LO, Lindbak AK, Møgster B, Namork E, Rye U, Stabbetorp G, Wisnes R, Aase B, Closs O.** *NIPH Ann*. 1991; 14: 67–79
- Fusci PC, Michon F, Tai JY, Blake MS.** *J Infect Dis*. 1997; 175: 364–372
- Fusco PC, Michon F, Laude-Sharp M, Minetti CA, Huang CH, Heron I, Blake MS.** *Vaccine* 1998; 16: 1842–1849
- Gavin AC, Bösche M, Krause R, Grandi P, Marzioch M, Bauer A, Schultz J, Rick JM, Michon AM, Cruciat CM, Remor M, Höfert C, Schelder M, Brajenovic M, Ruffner H, Merino A, Klein K, Hudak M, Dickson D, Rudi T, Gnau V, Bauch A, Bastuck S, Huhse B, Leutwein C, Heurtier MA, Copley RR, Edelmann A, Querfurth E, Rybin V, Drewes G, Raida M, Bouwmeester T, Bork P, Seraphin B, Kuster B, Neubauer G, Superti-Furga G.** *Nature*. 2002; 415:141–147
- Garavito RM, Ferguson-Miller S.** *J Biol Chem*. 2001; 276: 32403–32406

- Genevrois S, Steeghs L, Roholl P, Letesson JJ, van der Ley P. *EMBO J.* 2003; 22: 1780–1789.
- Giot L, Bader JS, Brouwer C, Chaudhuri A, Kuang B, Li Y, Hao YL, Ooi CE, Godwin B, Vitols E, Vijayadamodar G, Pochart P, Machineni H, Welsh M, Kong Y, Zerhusen B, Malcolm R, Varrone Z, Collis A, Minto M, Burgess S, McDaniel L, Stimpson E, Spriggs F, Williams J, Neurath K, Ioime N, Agee M, Voss E, Furtak K, Renzulli R, Aanensen N, Carrola S, Bickelhaupt E, Lazovatsky Y, DaSilva A, Zhong J, Stanyon CA, Finley RL Jr, White KP, Braverman M, Jarvie T, Gold S, Leach M, Knight J, Shimkets RA, McKenna MP, Chant J, Rothberg JM. *Science.* 2003; 5: 1727–1736.
- Gilkerson RW, Selker JM, Capaldi RA. *FEBS Lett.* 2003; 546: 355–358.
- Girard MP, Preziosi MP, Aguado MT, Kieny MP. *Vaccine.* 2006; 24: 4692–4700
- Grizot S, Buchanan SK. *Mol Microbiol.* 2004; 51:1027–1037
- Gómez JA, Criado MT, Ferreirós CM. *FEMS Immunol. Med. Microb.* 1997; 20: 79–86
- Görg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W. *Electrophoresis.* 2000; 21: 1037–1053
- Görg A, Postel W, Domscheit A, Gunther S. *Electrophoresis.* 1988; 9: 681–692
- Görg A, Weiss W, Dunn MJ. *Proteomics.* 2004; 4: 3665–3685
- Gorringe AR, Oakhill J. En: *Emerging strategies in the fight against meningitis: molecular and cellular aspects.* Ferreiros CM and Vazquez J (Eds.) Págs. 119–134. 2002. Horizon Scientific Press. Wymondham, Reino Unido.
- Gotschlich, E. C., and M. E. Seiff. *FEMS Microbiol. Lett.* 1987. 43:253–255
- Grizot S, Buchanan SK. *Mol Microbiol.* 2004; 51: 1027–1037
- Guédin S, Willery E, Tommassen J, Fort E, Drobecq H, Locht C, Jacob–Dubuisson F. *J Biol Chem.* 2001; 275: 30202–30210
- Gold R. En: *Evolution of meningococcal disease.* Vedros NA. (Ed). Vol 2, págs. 69–97. 1987. Crc Pr Llc. Boca Ratón. Florida.
- Gold R, Goldschneider I, Lepow ML, Draper TF, Randolph M. *J. Infect Dis.* 1978; 137: 112–121
- Goldehneider I, Gotslich EC, Artenstein MS. *J. Exp. Med.* 1969; 129: 1307–1326
- Gómez JA, Hernández E, Criado MT, Ferreirós CM. *Vaccine.* 1998; 16: 1633–1639
- Gorringe A, Halliwell D, Matheson M, Reddin K, Finney M, Hudson M. *Vaccine.* 2005; 23: 2210–2213
- Gotschlich EC, Goldschneider I, Artenstein MS. *J Exp Med.* 1969; 129: 1385–1395

- Hadi HA, Wooldridge KG, Robinson KR, Ala'Aldeen DAA.** *Mol Microbiol.* 2001; 41: 611–623
- Haines KA, Yeh L, Blake MS, Cristello P, Korchak H, Weissmann G.** *J Biol Chem.* 1988; 263: 945–951
- Hauck CR, Meyer TF.** *Curr Opin Microbiol.* 2003; 6: 43–49
- Hauck CR, Meyer TF.** *FEBS Lett.* 1997; 405: 86–90
- Henderson IR, Nataro JP.** *Infect Immun.* 2001; 69: 1231–1243
- Henderson IR, Navarro–Garcia F, Desvaux M, Fernandez RC, Ala'Aldeen D.** *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004; 68: 692–744
- Healy C.J, Baker C.M.** *The Pediatric Infectious Disease Journal* 2005; 24: 175–176
- Heuberger EH, Veenhoff LM, Duurkens RH, Friesen RH, Poolman B.** *J Mol Biol.* 2002; 317: 591–600
- Holten E.** *J. Clin. Microbiol.* 1979; 9: 186–188
- Hooker BS, Bigelow DJ, Lin CT.** *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 363: 457–461
- Hobbs MM, Malorny B, Prasad P, Morelli G, Kusecek B, Heckels JE, Cannon JG, Achtman M.** *Microbiology.* 1998; 144: 157–166
- Hobbs MM, Seiler A, Achtman M, Cannon JG.** *Mol Microbiol.* 1994; 12: 171–180
- Hong CS, Yamada T, Hashimoto W, Fialho AM, Das Gupta TK, Chakrabarty AM.** *Cell Cycle.* 2006; 5: 1633–1641
- Horwich AL, Fenton WA, Chapman E, Farr GW.** *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2007; 23: 115–145
- Ison CA, Anwar N, Cole MJ, Galassini R, Heyderman RS, Klein NJ, West J, Pollard AJ, Morley S, Levin and the Meningococcal R.** *Microbiol. Pathol.* 1999; 27: 207–214
- Ito HO, Nakashima T, So T, Hirata M, Inoue M.** *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 308: 770–776
- Jacob–Dubuisson F, Loch C, Antoine R.** *Mol Microbiol.* 2001; 1: 306–313
- Jansen C, Wiese A, Reubsaet L, Dekker N, de Cock H, Seydel U, Tommassen J.** *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1464: 284–298
- Jeanteur D, Lakey JH, Pattus F.** *Mol Microbiol.* 1991; 5: 2153–2164
- Jennings HJ, Roy R, Gamian A.** *J Immunol.* 1986; 137:1708–1713

- Jodar L, Cartwright K, Feavers IM. *Biologicals*. 2000; 28: 193–197
- Jódar L, Feavers IM, Salisbury D, Granoff DM. *Lancet*. 2002; 359: 1499–1508
- Jung C, Higgins CM, Xu Z. *Anal Biochem*. 2000; 286: 214–223
- Kashino Y. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2003; 797: 191–216
- Kawula TH, Aho EL, Barritt DS, Klapper DG, Cannon JG. *Infect Immun*. 1988; 56: 380–386
- Kawula TH, Spinola SM, Klapper DG, Cannon JG. *Mol Microbiol*. 1987. 1:179–185
- Kelly DF, Rappuoli R. *Adv Exp Med Biol*. 2005; 568: 217–223
- Kilian M, Reinholdt J, Lomholt H, Poulsen K, Frandsen EV. *APMIS*. 1996; 104: 321–338
- Kim JJ, Mandrell RE, Griffiss JM. *Infect. Immun*. 1989; 57: 602–608
- Klein C, García-Rizo C, Bisle B, Scheffer B, Zischka H, Pfeiffer F, Siedler F, Oesterhelt D. *Proteomics*. 2005; 5: 180–197
- Klugman KP, Gotschlich EC, Blake MS. *Infect Immun*. 1989; 57: 2066–2071
- Könninger UW, Hobbie S, Benz R, Braun V. *Mol Microbiol*. 1999; 32: 1212–1225
- Krall L, Wiedemann U, Unsin G, Weiss S, Domke N, Baron C. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99: 11405–11410
- Laemmli UK. *Nature*. 1970; 227: 680–685
- Li S, Armstrong CM, Bertin N, Ge H, Milstein S, Boxem M, Vidalain PO, Han JD, Chesneau A, Hao T, Goldberg DS, Li N, Martinez M, Rual JF, Lamesch P, Xu L, Tewari M, Wong SL, Zhang LV, Berriz GF, Jacotot L, Vaglio P, Reboul J, Hirozane-Kishikawa T, Li Q, Gabel HW, Elewa A, Baumgartner B, Rose DJ, Yu H, Bosak S, Sequerra R, Fraser A, Mango SE, Saxton WM, Strome S, Van Den Heuvel S, Piano F, Vandenhoute J, Sardet C, Gerstein M, Doucette-Stamm L, Gunsalus KC, Harper JW, Cusick ME, Roth FP, Hill DE, Vidal M. *Science*. 2004; 23: 540–543
- Li Y, Zhang Q, Winterbotham M, Mowe E, Gorringer A. *Infect Immun*. 2006; 74: 6348–6355
- Lin L, Ayala P, Larson J, Mulks M, Fukuda M, Carlsson SR, Enns C, So M. *Mol Microbiol*. 1997; 24: 1083–1094
- Linse S, James P. *Proteomics*. 2007; 7: 2833–2842
- Lissolo L, Dumas P, Maitre G, Quentin-Millet MJ. En: *Pathobiology and Immunobiology of Neisseriaceae*. Conde-Glez CJ, Morse S, Rice P, Sparling F and Calderon E. (Eds). Págs. 399–405. 1994. Publications Office INSP. Mexico.



- Longworth E, Borrow R, Goldblatt D, Balmer P, Dawson M, Andrews N, Miller E, Cartwright K. *Vaccine*. 2002; 20: 2592–2596.
- Lund T, Delves PJ. *Rev Reprod*. 1998; 3: 71–76
- McGuinness BT, Lambden PR, Heckels JE. *Mol Microbiol*. 1993; 7: 505–514
- Minetti CA, Blake MS, Remeta DP. *J Biol Chem*. 1997; 272: 10710–10720
- Minetti CA, Blake MS, Remeta DP. *J Biol Chem*. 1998; 273: 25329–25338
- Moe GR, Tan S, Granoff DM. *Infect Immun*. 1999; 67: 5664–5675
- Moore J, Bailey SE, Benmechernene Z, Tzitzilonis C, Griffiths NJ, Virji M, Derrick JP. *J Biol Chem*. 2005; 280: 31489–31497
- Morley SL, Pollard AJ. *Vaccine*. 2002; 20: 666–687
- Moore PS, Reeves MW, Schwartz B, Gellin BG, Broome CV. *Lancet*. 1989; 2: 260–263
- Maelan J, Wedege E. *AMPS*. 1989; 97: 774–780
- Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95: 3140–3145
- Martín D, Cadieux N, Ámel J, Brodeur BR. *J. Exp. Med*. 1997; 185: 1173–1183
- Massari P, Ho Y, Wetzler LM. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97: 9070–9075.
- Massari P, King CA, MacLeod H, Wetzler LM. *Protein Expr Purif*. 2005; 44: 136–146
- Mauro A, Blake M, Labarca P. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988; 85: 1071–107
- Mayer LW, Reeves MW, Al-Hamdan N, Sacchi CT, Taha MK, Ajello GW, Schmink SE, Noble CA, Tondella ML, Whitney AM, Al-Mazrou Y, Al-Jefri M, Mishkhis A, Sabban S, Caugant DA, Lingappa J, Rosenstein NE, Popovic T. *J Infect Dis*. 2002; 185: 1596–1605
- Mattow J, Siejak F, Hagens K, Schmidt F, Koehler C, Treumann A, Schaible UE, Kaufmann SH. *Proteomics*. 2007; 7: 1687–1701
- Matyus L. *J Photochem. Photobiol. B*. 1992; 12: 323–337
- McGee ZA, Street CH, Chappell CL, Cousar ES, Morris F, Horn RG. Horn RG. *Infect Immun*. 1979; 24: 194–201
- Melcher K. *Curr Protein Pept Sci*. 2004; 5: 287–296
- Minetti CA, Blake MS, Remeta DP. *J Biol Chem*. 1998; 273: 25329–25338.

- Minetti CA, Tai JY, Blake MS, Pullen JK, Liang SM, Remeta DP.** *J Biol Chem.* 1997; 272: 10710–10720
- Molinari, M.; Helenius, A.** En: *Methods in Enzimology*. Sies H and Packers L (Eds.). Págs. 35–42. 2002. Academic Press. New York.
- Muenzner P, Dehio C, Fujiwara T, Achtman M, Meyer TF, Gray–Owen SD. Gray–Owen SD.** *Infect. Immun.* 2000; 68: 3601–3607
- Munkley A, Tinsley CR, Virji M, Heckels JE.** *Microb Pathog.* 1991; 11: 447–452
- Neff D, Dencher NA.** *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 259: 569–575
- Newhall WJ, Wilde CE, Sawyer WD, Haak RA.** *Infect. Immun.* 1980; 27: 475–482
- Nikaido H.** *J Biol Chem.* 1994; 269: 3905–3908.
- Obermaier C, Jankowski V, Schmutzler C, Bauer J, Wildgruber R, Infanger M, Köhrle J, Krause E, Weber G, Grimm D.** *Electrophoresis.* 2005; 26: 2109–2116
- O'Farrell PH.** *J Biol Chem.* 1975; 250: 4007–4021
- Oliver KJ, Reddin KM, Bracegirdle P, Hudson MJ, Borrow R, Borrow R, Feavers IM, Robinson A, Cartwright K, Gorringe AR.** *Infect Immun.* 2002; 3621–3626
- Pannekoek Y, van Putten JPM, Dankert J.** *J Bacteriol.* 1992; 174 6928–6937
- Peak IRA, Srikhanta Y, Dieckelmann M, Moxon ER, Jennings MP.** *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2000; 28: 329–334
- Pedersen SK, Harry JL, Sebastian L, Baker J, Traini MD, McCarthy JT, Manoharan A, Wilkins MR, Gooley AA, Righetti PG, Packer NH, Williams KL, Herbert BR .** *J Proteome Res.* 2003; 2: 303–311
- Perkins–Balding D, Ratliff–Griffin M, Stojiljkovic I.** *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004; 68: 154–171.
- Perkins–Balding D, Baer MT, Stojiljkovic I.** *Microbiology.* 2003; 149: 3423–3435
- Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS.** *Electrophoresis.* 1999; 20: 3551–3567
- Pettersson A, Kortekaas J, Weynants VE, Voet P, Poolman JT, Bos MP, Tommassen J.** *Vaccine.* 2006; 24: 3545–3557
- Phizicky EM, Fields S.** *Microbiol Rev.* 1995; 59: 94–123
- Pintor M, Gómez JA, Ferrón L, Ferreirós CM, Criado MT.** *J Med Microbiol.* 1998; 47: 757–760

- Pizza M, Scarlato V, Massignani V, Giuliani MM, Arico B, Comanducci M, Jennings GT, Baldi L, Bartolini E, Capecchi B, Galeotti CL, Luzzi E, Manetti R, Marchetti E, Mora M, Nuti S, Ratti G, Santini L, Savino S, Scarselli M, Storni E, Zuo P, Broeker M, Hundt E, Knapp B, Blair E, Mason T, Tettelin H, Hood DW, Jeffries AC, Saunders NJ, Granoff DM, Venter JC, Moxon ER, Grandi G, Rappuoli R. *Science*. 2000; 287: 1816–1820
- Plested JS, Makepeace K, Jennings MP, Gidney MA, Lacelle S, Brisson J, Cox AD, Martin A, Bird AG, Tang CM, Mackinnon FM, Richards JC, Moxon ER. *Infect Immun*. 1999; 67: 5417–5426
- Poetsch A, Neff D, Seelert H, Schägger H, Dencher NA. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1466: 339–349.
- Pohlner J, Halter R, Beyreuther K, Meyer TF. *Nature*. 1987; 325: 458–462
- Pollard AJ, Frasch C. *Vaccine*. 2001; 19: 1327–1346
- Post DM, Zhang D, Eastvold JS, Teghanemt A, Gibson BW, Weiss JP. *J Biol Chem*. 2005; 280: 38383–38394
- Prinz T, Tommassen J. *FEMS Microbiol Lett*. 2000; 183: 49–53
- Pugsley AP. *Microbiol Rev*. 1993; 57: 50–108
- Qu J, Mayer C, Behrens S, Holst O, Kleinschmidt JH. *J Mol Biol*. 2007; 374: 91–105
- Rais I, Karas M, Schägger H. *Proteomics*. 2004; 4: 2567–2571
- Rappuoli R. *Vaccine*. 2001; 19: 2688–2691
- Rappuoli R. *Nat Med*. 2004; 10: 1177–1185
- Reynolds JA, Tanford C. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1970; 66: 1002–1007
- Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, Eilm M, Mann S. *Nat Biotechnol*. 1999; 17: 1030–1032
- Righetti PG. *Electrophoresis*. 2007; 28: 545–555
- Robbins JB, Schneerson R, Vann WF, Bryla DA, Fattom A. *Ann N Y Acad Sci*. 1995; 31: 754: 68–82
- Robinson A, Melling J. *J. App. Bact*. 1993; 74: 43S–51S
- Rodríguez AP, Dickinson F, Baly A, Martínez R. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999; 94: 433–440
- Rokbi B, Renaud-Mongenie G, Mignon M, Danve B, Poncet D, Chabanel C, Caugant DA, Quentin-Millet MJ. *Infect. Immun*. 2000 ; 68: 4938–4947

- Rosenstein NE, Perkins BA, Stephens DS, Lefkowitz L, Cartter ML, Danila R, Cieslak P, Shutt KA, Popovic T, Schuchat A, Harrison LH, Reingold AL. *J Infect Dis.* 1999; 180: 1894–1901
- Rosenqvist E, Musacchio A, Aase A, Høiby EA, Namork E, Kolberg J, Wedege E, Delvig A, Dalseg R, Michaelsen TE, Tommassen J. *Infect Immun.* 1999; 67: 1267–1276
- Rosenqvist E, Høiby EA, Wedege E, Kusecek B, Achtman M. *J Infect Dis.* 1993; 167: 1065–1073
- Rual JF, Venkatesan K, Hao T, Hirozane-Kishikawa T, Dricot A, Li N, Berriz GF, Gibbons FD, Dreze M, Ayivi-Guedehoussou N, Klitgord N, Simon C, Boxem M, Milstein S, Rosenberg J, Goldberg DS, Zhang LV, Wong SL, Franklin G, Li S, Albala JS, Lim J, Fraughton C, Llamas E, Cevik S, Bex C, Lamesch P, Sikorski RS, Vandenhaute J, Zoghbi HY, Smolyar A, Bosak S, Sequerra R, Doucette-Stamm L, Cusick ME, Hill DE, Roth FP, Vidal M. *Nature.* 2005 20; 437: 1173–1178
- Rudel T, Schmid A, Benz R, Kolb HA, Lang F, Meyer TF. *Cell.* 1996; 85: 391–402
- Sánchez S, Arenas J, Abel A, Criado MT, Ferreirós CM. *J Proteome Res.* 2005; 4: 91–95
- Sánchez S, Abel A, Arenas J, Criado MT, Ferreirós CM. *Res Microbiol.* 2006; 157: 136–142
- Sanchez S, Troncoso G, Ferreiros CM, Criado MT. *Vaccine.* 2001; 19: 3390–3398
- Santoni V, Molloy M, Rabilloud T. *Electrophoresis.* 2000; 21: 1054–1070
- Schagger H, von Jagow G. *Anal Biochem.* 1991; 199: 223–231
- Schägger H. Tricine–SDS–PAGE. *Nat Protoc.* 2006; 1: 16–22
- Schauder S, Penna L, Ritton A, Manin C, Parker F, Renauld–Mongénie G. *J Bacteriol.* 2005; 187: 392–395
- Scholten RJ, Kuipers B, Valkenburg HA, Dankert J, Zollinger WD, Poolman JT. *J Med Microbiol.* 1994; 41: 236–243
- Senior BW, Stewart WW, Galloway C, Kerr MA. *J Infect Dis.* 2001; 184: 922–925
- Serruto D, Adu–Bobie J, Scarselli M, Veggi D, Pizza M, Rappuoli R, Aricò B. *Mol. Microbiol.* 2003; 48: 323–334
- Shi L, Chen B, Wang Z, Elias DA, Mayer MU, Gorby YA, Ni S, Lower BH, Kennedy DW, Wunschel DS, Mottaz HM, Marshall MJ, Hill EA, Beliaev AS, Zachara JM, Fredrickson JK, Squier TC. *J Bacteriol.* 2006; 188: 4705–4714

- Sierra CV, Campa HC, Varcacel NM, Varcacel NM, Garcia IL, Izquierdo PL, Sotolongo PF, Casanueva GV, Rico CO, Rodriguez CR, Terry MH. *NIPH Ann.* 1991; 14: 195–210
- Sijbrandi R, Urbanus ML, ten Hagen–Jongman CM, Bernstein HD, Oudega B, Otto BR, Luirink J. *J Biol Chem.* 2003; 278: 4654–4659
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. *Anal Biochem.* 1985; 150: 76–78
- Sommer A, Traut RR. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1974; 71: 3946–3950
- Song J, Minetti CA, Blake MS, Colombini M. *Biochim Biophys Acta* 1998;1370: 289–298
- Sprinzak E, Sattath S, Margalit H. *J Mol Biol.* 2003; 11: 919–923
- Stern, A., and T. F. Meyer. *Mol Microbiol.* 1987; 1: 5–12
- Stoevesandt O, Brock R. *Na. Protoc.* 2006; 1: 223–229
- Swartley JS, Marfin AA, Edupuganti S, Liu LJ, Cieslak P, Perkins B, Wenger JD, Stephens DS. *Infect Immun.* 1999; 67: 2449–2451
- Sunderhaus S, Dudkina NV, Jänsch L, Klodmann J, Heinemeyer J, Perales M, Zabaleta E, Boekema EJ, Braun HP. *J Biol Chem.* 2006; 281: 6482–6488
- Surana NK, Grass S, Hardy GG, Li H, Thanassi DG, Geme JW 3rd. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101: 14497–14502
- Swank RT, Munkres KD. *Anal Biochem.* 1971; 39: 462–477
- Swanson J. *Infect Immun.* 1978 ; 19: 320–331
- Tappero JW, Lagos R, Ballesteros AM, Plikaytis B, Williams D, Dykes J, Gheesling LL, Carlone GM, Høiby EA, Holst J, Nøkleby H, Rosenqvist E, Sierra G, Campa C, Sotolongo F, Vega J, Garcia J, Herrera P, Poolman JT, Perkins BA. *JAMA.* 1999; 281: 1520–1527
- Taha MK, Zarantonelli ML, Alonso JM, Naess LM, Holst J, Feiring B, Rosenqvist E. *Vaccine.* 2007; 25: 2537–2538
- Tettelin H, Saunders NJ, Heidelberg J, Jeffries AC, Nelson KE, Eisen JA, Ketchum KA, Hood DW, Peden JF, Dodson RJ, Nelson WC, Gwinn ML, DeBoy R, Peterson JD, Hickey EK, Haft DH, Salzberg SL, White O, Fleischmann RD, Dougherty BA, Mason T, Ciecko A, Parksey DS, Blair E, Cittone H, Clark EB, Cotton MD, Utterback TR, Khouri H, Qin H, Vamathevan J, Gill J, Scarlato V, Masignani V, Pizza M, Grandi G, Sun L, Smith HO, Fraser CM, Moxon ER, Rappuoli R, Venter JC. *Science.* 2000; 287: 1809–1815
- Teyssou R, Muros–Le Rouzic E. *Vaccine.* 2007; 3: 3–7

- Tramont EC, Sadoff JC, Artenstein MS.** *J. Infect. Dis.* 1974; 130: 240–247
- Troncoso G, Sánchez S, Kolberg J, Rosenqvist E, Veiga M, Ferreirós CM, Criado M.** *FEMS Microbiol Lett.* 2001; 199: 171–176
- Troncoso G, Sánchez S, Moreda M, Criado MT, Ferreirós CM.** *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2000; 27: 103–109
- Tsai CM, Frasch CE, Mocca L.** *J Bacteriol.* 1981; 146: 69–78
- Tzanakaki G, Mastrantonio P.** *Int J Antimicrob Agents.* 2007; 29: 621–629
- Uetz P, Giot L, Cagney G, Mansfield TA, Judson RS, Knight JR, Lockshon D, Narayan V, Srinivasan M, Pochart P, Qureshi-Emili A, Li Y, Godwin B, Conover D, Kalbfleisch T, Vijayadamodar G, Yang M, Johnston M, Fields S, Rothberg JM.** *Nature.* 2000 Feb 10; 403: 623–627
- Ulmer JB, Burke CJ, Shi C, Friedman A, Donnelly JJ, Liu MA.** *J. Biol. Chem.* 1992; 67: 19266–19271
- Uli L, Castellanos-Serra L, Betancourt L, Domínguez F, Barberá R, Sotolongo F, Guillén G, Pajón Feyt R.** *Proteomics.* 2006; 6: 3389–3399
- Valkenburg HA, Dankert J, Zollinger WD, Poolman JT.** *J Med Microbiol.* 1994; 41: 236–243
- van den Dobbelaars GP, van Dijken HH, Pillai S, van Alphen L.** *Vaccine.* 2007; 25: 2491–2496
- van den Dobbelaars G, van Dijken H, Hamstra HJ, Ummels R, Van Alphen L Van der Ley P.** En: *Proceedings of the 14th International Pathogenic Neisseria Conference.* Apicella MA and Seifert HS (Eds.) Pág. 153. 2004. Milwaukee, WI.
- van der Ley P, Heckels JE, Virji M, Hoogerhout P, Poolman JT.** *Infect Immun.* 1991; 59: 2963–2971
- van Deuren M, Brandtzaeg P, van der Meer JW.** *Clin Microbiol Rev.* 2000; 13: 144–166
- Van Gelder P, Tommassen J.** *J Bacteriol.* 1996; 178: 5320–5322
- van Putten JP, Duensing TD, Carlson J.** *J. Exp. Med.* 1998; 188 941–952
- van Putten JP.** *Med Microbiol Immunol.* 1990; 179: 289–295
- van Ulsen P, Tommassen J.** *FEMS Microbiol Rev.* 2006; 30: 292–319
- van Ulsen P, Adler B, Fassler P, Gilbert M, van Schilfgaarde M, van der Ley P, van Alphen L, Tommassen J.** *Microbes Infect.* 2006; 8: 2088–2097

- Vaughan TE, Skipp PJ, O'Connor CD, Hudson MJ, Vipond R, Elmore MJ, Gorringe AR. *Vaccine*. 2006; 24: 5277–5293
- Vereb G, Szöllosi J, Matkó J, Nagy P, Farkas T, Vigh L, Mátyus L, Waldmann TA, Damjanovich S. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100: 8053–8058
- Verma S, Xiong Y, Mayer MU, Squier TC. *Biochemistry* 2007; 46: 3023–3035
- Vipond C, Suker J, Jones C, Tang C, Feavers IM, Wheeler JX. *Proteomics*. 2006; 6: 3400–3413
- Virji M, Makepeace K, Ferguson DJ, Achtman M, Moxon ER. *Mol Microbiol*. 1993; 10: 499–510
- von Mering C, Krause R, Snel B, Cornell M, Oliver SG, Fields S, Bork P. *Nature*. 2002; 417: 399–403
- Voulhoux R, Bos MP, Geurtsen J, Mols M, Tommassen J. *Science*. 2003; 299: 262–265
- Wang LY, Frasch CE. *Infect. Immun*. 1984; 46: 408–404
- Wang ZJ, Xu XP, Fan KQ, Jia CJ, Yang KQ. *J Biochem Biophys Methods*. 2007; 70: 565–572
- Weel JF, van Putten JP. *Res. Microbiol*. 1991; 142: 985–993
- Weiser, J. N., D. Bae, C. Fasching, R. W. Scamurra, A. J. Ratner, and E. N. Janoff. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100: 4215–4220
- West D, Reddin K, Matheson M, Heath R, Funnell S, Hudson M, Robinson A, Gorringe A. *Infect Immun*. 2001; 69: 1561–1567
- L.M. Wetzler. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 1994; 730: 367–370
- Wilder-Smith A, Barkham TM, Earnest A, Paton NI. *BMJ*. 2002; 325: 365–366
- Williams TI, Combs JC, Thakur AP, Strobel HJ, Lynn BC. *Electrophoresis*. 2006; 27: 2984–2995
- Wilkins MR, Williams KL, Appel RD, Hochstrasser DF. (eds). 1997. *Proteome research: New frontiers in functional genomics*, Springer-Verlag, Berlin
- Wittig I, Braun HP, Schägger H. *Nat Protoc*. 2006; 1: 418–428
- Wittig I, Karas M, Schägger H. *Mol Cell Proteomics*. 2007; 6: 1215–1225
- Wittig I, Schägger H. *Proteomics*. 2005; 5: 4338–4346.

- Wolff K, Stern A.** *FEMS Microbiol Lett.* 1995; 125: 255–263.
- Woods JP, Dempsey JF, Kawula TH, Barritt DS, Cannon JG.** *Mol Microbiol.* 1989; 3: 583–591
- Wu HJ, Seib KL, Edwards JL, Apicella MA, McEwan AG, Jennings MP.** *Infect Immun.* 2005; 73: 8444–8448
- Wu T, Malinverni J, Ruiz N, Kim S, Silhavy TJ, Kahne D.** *Cell.* 2005; 121: 235–245
- Yamashita MM, Almassy RJ, Janson CA, Cascio D, Eisenberg D.** *J Biol Chem.* 1989; 264:17681–17690
- Young J, Holland IB.** *Biochem Biophys Acta.* 1999; 1461: 177–200
- Young JD, Blake M, Mauro A, Cohn ZA.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983; 80: 3831–3835
- Zhang L, Xie J, Wang X, Liu X, Tang X, Cao R, Hu W, Nie S, Fan C, Liang S.** *Proteomics.* 2005; 5: 4510–4524
- Zimmerman SB, Minton AP.** *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 1993; 22: 27–65
- Zollinger WD, Mandrell RE, Altieri P, Berman S, Lowenthal J, Artenstein MS.** *J Infect Dis.* 1978; 137: 728–739





